

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 979**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/42</b>	(2007.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/00</b>	(2006.01)
<b>A61L 26/00</b>	(2006.01)
<b>A61L 15/32</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/61</b>	(2007.01)
<b>A61L 33/12</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2014 PCT/JP2014/057927**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14162906**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2014 E 14778631 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2980098**

54 Título: **Complejo de cadena de azúcar-polipéptido**

30 Prioridad:

**30.03.2013 JP 2013075493**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.03.2019**

73 Titular/es:

**GLYTECH, INC. (100.0%)  
134 Chudoji-minamimachi, Shimogyo-ku  
Kyoto-shi, Kyoto 600-8813, JP**

72 Inventor/es:

**SAIJO, HAYATO;  
OCHIAI, HIROFUMI;  
TAZURU, KEISUKE y  
SHIMODA, TAIJI**

74 Agente/Representante:

**RIZZO , Sergio**

ES 2 703 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Complejo de cadena de azúcar-polipéptido

Campo técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un complejo de cadena de azúcar-polipéptido en donde una cadena de azúcar está unida a un polipéptido.

Antecedentes de la invención

**[0002]** Se utilizan biogeles tales como hidrogel y pegamento de fibrina como matriz de investigación para cultivos tridimensionales, etc., matrices quirúrgicas tales como hemostáticos pre/postoperatorios o láminas para cicatrización de heridas, sistemas de administración de fármacos (DDS) y similares.

10 **[0003]** Sin embargo, dado que muchos de estos emplean materiales de origen biológico, existen riesgos tales como la infección por microorganismos tales como virus, inmunogenicidad y transmisión de enfermedades con el uso de los mismos. Por ejemplo, aunque el pegamento de fibrina tiene un alto valor de utilidad como hemostático durante la cirugía, debido a que el material de origen se deriva de la sangre humana, hubo varios casos de pacientes infectados por el virus de la hepatitis que habían contaminado el pegamento de fibrina en el uso real durante la cirugía, causando así un gran problema social. También existe el problema de que los geles de calidad homogénea no siempre pueden suministrarse con biogeles de origen biológico.

15 **[0004]** En contraste con los biogeles de origen biológico, se sabe que los biogeles fabricados por síntesis química no tienen riesgo de infección y son capaces de proporcionar geles de calidad homogénea (Literatura de Patentes 1). El documento WO2008113030 describe péptidos fabricados de autoensamblaje que pueden formar un gel y pueden usarse para hemostasia.

20 **[0005]** Sin embargo, los biogeles conocidos hasta la fecha requieren procedimientos tales como el intercambio de regulador o la sustitución y la mezcla de múltiples agentes cuando se forma un gel, y la operación es complicada. Además, no solo los reactivos o disolventes que se usan en combinación están limitados porque la solubilidad es baja dependiendo del rango de pH, sino que también existen problemas, como la limitación de los sitios aplicables (sitios afectados) y la obstrucción de las jeringas o tubos durante el uso. Además, la baja solubilidad (es decir, no transparente), particularmente en el rango neutro que está cerca del pH biológico, complicará el empleo en situaciones que requieren visibilidad, como el campo de la cirugía.

Lista de citaciones

**[0006]** [Literatura de Patentes 1] Patente de los Estados Unidos No. 5670483

30 Resumen de la invención

Problema para ser resuelto por la invención

**[0007]** El objeto de la presente invención es proporcionar un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que pueda formar un hidrogel transparente y homogéneo en un amplio intervalo de pH.

Medios para resolver el problema

35 **[0008]** Como resultado de una extensa investigación realizada por los presentes inventores para resolver dicho problema, se encontró sorprendentemente que un complejo de cadena de azúcar-polipéptido, fabricado uniendo una cadena de azúcar a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la cual los residuos de aminoácidos polares y no polares se disponen alternativamente, muestra una alta solubilidad en agua y forma un hidrogel transparente y homogéneo en un amplio rango de pH, particularmente en el rango neutro, lo que conduce a la completitud de la presente invención.

40 **[0009]** En otras palabras, la presente invención proporciona un complejo de cadena de azúcar-polipéptido caracterizado porque dicho polipéptido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 8-34 residuos de aminoácidos en los que los residuos de aminoácidos polares y no polares están dispuestos alternativamente, y una o más cadenas de azúcar están unidas a dicho polipéptido.

45 **[0010]** El número total de residuos de azúcares presentes en la una o más cadenas de azúcar unidas al polipéptido es 5 o más.

**[0011]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque dicho complejo de cadena de azúcar-polipéptido puede formar un hidrogel que comprende una estructura de lámina  $\beta$  por autoensamblaje en una solución acuosa que tiene un pH aproximadamente neutro.

50 **[0012]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque cada uno de dichos residuos de aminoácidos polares es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en un residuo de

aspartato, un residuo de glutamato, un residuo de arginina, un residuo de lisina, residuo de histidina, un residuo de tirosina, un residuo de serina, un residuo de treonina, un residuo de asparagina, un residuo de glutamina y un residuo de cisteína.

5 **[0013]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque cada uno de dichos residuos de aminoácidos no polares es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en un residuo de alanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, residuo de metionina, un residuo de fenilalanina, un residuo de triptófano, un residuo de prolina y un residuo de glicina.

10 **[0014]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque cada uno de dichos residuos de aminoácidos polares es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en un residuo de aspartato, un residuo de glutamato, un residuo de arginina y un residuo de treonina, y cada uno de dichos aminoácidos no polares es un residuo de alanina.

**[0015]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque dicha secuencia de aminoácidos es una secuencia repetitiva "RADA" o una secuencia repetitiva "RATARAEA".

15 **[0016]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque dicha secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RADARADARADARADA (SEQ ID NO. 1), RADARADARADARADARADA (SEQ ID NO. 2) y RATARAEARATARAEA (SEQ ID NO. 3).

**[0017]** La presente invención se caracteriza porque el número total de residuos de azúcares presentes en una o más cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es de 5 o más.

20 **[0018]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 1, 2 o 3.

25 **[0019]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque las cadenas de azúcar están unidas a cada aminoácido hasta la posición  $x$  contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido y cada aminoácido hasta la posición  $y$  contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal (donde  $x$  e  $y$  son números enteros,  $x \geq 0$ ,  $y \geq 0$ , y  $x + y$  es el número total de cadenas de azúcar unidas al polipéptido).

30 **[0020]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 1, 2 o 3, en donde cuando el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 1, dicha cadena de azúcar está unida al residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido o el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal,

cuando el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 2, dichas dos cadenas de azúcar están unidas a residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en (1)-(3) a continuación:

- 35
- (1) el primer y el segundo residuo de aminoácido contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido,
  - (2) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal de dicho polipéptido, y
  - (3) el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido y el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal de dicho polipéptido, y

40 cuando el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 3, dichas tres cadenas de azúcar están unidas a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en (1)-(4) a continuación:

- 45
- (1) los residuos de aminoácidos primero, segundo y tercero contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido,
  - (2) los residuos de aminoácidos primero, segundo y tercero contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal de dicho polipéptido,
  - (3) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido, así como el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal de dicho polipéptido, y
  - (4) el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido, así como los residuos de aminoácido posicionados en la posición 1 y 2 contando desde el extremo C-terminal de dicho polipéptido.
- 50

**[0021]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque dicha cadena de azúcar es una cadena de azúcar con una ramificación.

55 **[0022]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque dicha cadena de azúcar es una cadena de azúcar seleccionada del grupo que consiste en una cadena de azúcar disialo, una cadena de azúcar asialo, una cadena de azúcar diGlcNAc, una cadena de azúcar dimanosa, una cadena de azúcar GlcNAc, una

cadena de azúcar maltotriosa, una cadena de azúcar maltosa, una cadena de azúcar maltotetraosa, una cadena de azúcar maltoheptosa,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina.

5 **[0023]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque es una composición para la formación de hidrogel que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención. Además, dicha composición para la formación de hidrogel puede ser una composición farmacéutica hemostática, una composición para vehículo de liberación controlada o una composición para matriz de cultivo.

10 **[0024]** Además, una realización de la presente invención se caracteriza porque es una composición que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención en donde dicha composición está en un estado de hidrogel. Además, dicha composición puede ser una composición farmacéutica hemostática, una composición para vehículo de liberación controlada o una composición para matriz de cultivo.

Efectos de la invención.

15 **[0025]** Debido a que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido según la presente invención tiene una alta solubilidad en agua en un amplio rango de pH que comprende el rango neutro y forma un hidrogel transparente y uniforme, está menos sujeto a la limitación de los reactivos o solventes que se usan en combinación, y puede ser empleado para diversas aplicaciones. Además, debido a que puede emplearse en un amplio rango de pH, está menos sujeto a la limitación de los sitios aplicables (sitios afectados).

20 **[0026]** Además, debido a que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una alta solubilidad en agua en un amplio rango de pH que comprende el rango neutro y forma un hidrogel uniforme y transparente, los estados de sol y gel pueden estar presentes reversiblemente en un pH neutro. En otras palabras, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido puede formar un estado de gel una vez y luego estar en estado de sol por agitación mecánica, y todavía estar en estado de gel nuevamente. Por consiguiente, puede distribuirse en un estado de gel (es decir, un estado listo para usar), y no requiere operaciones complicadas como con otros geles peptídicos como el intercambio de regulador (o sustitución) para lograr un pH neutro después de formar un gel a un pH adecuado para gelificación (por ejemplo, pH ácido).  
25 En otras palabras, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención es extremadamente superior en operatividad en comparación con otros geles peptídicos. Además, debido a que el rango de pH en donde se puede usar el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención es amplio, los problemas tales como la obstrucción de jeringas y tubos con el uso ocurren con menos frecuencia.

30 **[0027]** Además, como el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención se modifica por una cadena de azúcar que existe in vivo en animales, la antigenicidad se reduce en comparación con un péptido sin ninguna modificación. Además, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención casi no tiene riesgo de producir toxicidad, tal como la que se observa con un compuesto modificado con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). Por consiguiente, el complejo de cadena de  
35 azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una alta seguridad para uso biológico.

**[0028]** Además, también queda claro a partir de los Ejemplos en el presente documento que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención forma un hidrogel más transparente y uniforme en comparación con un polipéptido unido a PEG.

40 **[0029]** Además, debido a que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención forma un hidrogel uniforme y transparente en condiciones fisiológicas (rango neutro) y tiene baja antigenicidad, es preferible como un hidrogel para uso animal *in vivo*.

45 **[0030]** Más específicamente, debido a que un hidrogel que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una característica para mantener un estado de gel transparente y uniforme incluso en condiciones que comprenden plasma sanguíneo de alta concentración en un pH neutro, tiene un alto valor de utilidad como por ejemplo un hemostático.

**[0031]** Además, debido a que un hidrogel que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención tiene una liberación controlada alta cuando encapsula una proteína ácida o una básica en un pH neutro, tiene un alto valor de utilidad como un vehículo de liberación controlada para diversas sustancias.

50 Breve descripción de los dibujos

**[0032]**

La Figura 1 presenta fotografías que muestran el resultado de las pruebas de carga con bolas de acero para (RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 a varios pH.

55 La Figura 2 presenta fotografías que muestran el resultado de las pruebas de carga con bolas de acero para (RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 cuando se trata de plasma sanguíneo en diversas concentraciones.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de medición del efecto de liberación controlada para (RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 cuando se encapsula una proteína ácida.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de medición del efecto de liberación controlada para (RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 cuando se encapsula una proteína básica.

5 La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de medición de dicroísmo circular (CD) para (RADA)4 a pH 2 o pH 7.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de medición de dicroísmo circular (CD) para C(DiGlcNAc)-(RADA)4 a pH 2 o pH 7.

10 La Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la viscosidad cinética para (RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 a pH 7.

#### Descripción de las realizaciones

**[0033]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido según la presente invención puede ser de origen biológico o puede fabricarse por síntesis química, pero preferiblemente se fabrica por síntesis química por aspectos de estabilidad de seguridad o calidad y uniformidad de cadenas de azúcar.

15 **[0034]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención puede por ejemplo autoensamblarse en una solución acuosa a través de interacciones como la interacción electrostática entre moléculas peptídicas, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. Un complejo de cadena de azúcar-polipéptido "autoensamblado" en una solución acuosa como se usa aquí significa que los polipéptidos se ensamblan espontáneamente entre sí a través de algún tipo de interacción (por ejemplo, interacción  
20 electrostática, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacción hidrófoba) en una solución acuosa, y no debe interpretarse con un significado limitante.

**[0035]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido según la presente invención puede autoensamblarse y formar una estructura de lámina  $\beta$  en una solución acuosa. Además, se puede formar un hidrogel por capas múltiples de dichas estructuras de lámina  $\beta$ . El método para confirmar que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido forma una estructura de lámina  $\beta$  en una solución acuosa no está particularmente limitado, y puede verificarse, por ejemplo, medir el dicroísmo circular (CD) de una solución acuosa que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido. Debido a que generalmente como una característica de una molécula que tiene una estructura de lámina  $\beta$  se observa una absorbancia positiva a una longitud de onda de alrededor de 197 nm y se ve una absorbancia negativa a una longitud de onda de aproximadamente 216 nm, la formación de la estructura de lámina  $\beta$  puede confirmarse verificando los picos alrededor de estas longitudes de onda mediante medición por dicroísmo circular.  
25  
30

**[0036]** Debido a que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos polares y no polares están dispuestos alternativamente, solo los residuos de aminoácidos polares pueden estar dispuestos en un lado de la estructura de la lámina  $\beta$  y solo los residuos de aminoácidos no polares pueden disponerse en el otro lado cuando se forma una estructura de lámina  $\beta$  en una solución acuosa. Por consiguiente, dicha estructura de lámina  $\beta$  puede ensamblarse de tal manera que oculte los lados hidrófobos (los lados con solo residuos de aminoácidos no polares dispuestos) para formar una estructura bicapa. Posteriormente, esta estructura en capas de lámina  $\beta$  se ampliará a medida que el autoensamblaje molecular progrese para formar una conformación tridimensional (por ejemplo, un hidrogel). Un polipéptido que tiene tal naturaleza se puede describir en este documento como un SAP (Péptido de autoensamblaje).  
35  
40

**[0037]** Un "pH aproximadamente neutro" como se usa en este documento significa que el pH está alrededor de 7.0, más específicamente que el pH está en el rango de 5.0 a 9.0, preferiblemente que el pH está en el rango de 6.0 a 8.0.

45 **[0038]** Una realización de la presente invención se caracteriza porque el complejo de cadena de azúcar-polipéptido puede autoensamblarse en una solución acuosa que tiene un pH aproximadamente neutro para formar un hidrogel que comprende una estructura de lámina  $\beta$ . No se excluyen aquellos que puedan autoensamblarse incluso en una solución acuosa que tenga un pH distinto al neutro para formar un hidrogel que comprende una estructura de lámina  $\beta$ , siempre que posean dicha característica.

50 **[0039]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos polares y no polares están dispuestos alternativamente. La longitud de dicha secuencia de aminoácidos no está limitada, y preferiblemente puede ser una secuencia de aminoácidos que consiste en 8-34 residuos de aminoácidos, más preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en 12-25 residuos de aminoácidos, y aún más preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consistente en 16-21 residuos de aminoácidos.  
55

**[0040]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos polares y no polares están dispuestos alternativamente. Un "aminoácido" como se usa en el presente documento se emplea

en su sentido más amplio, y comprende no solo aminoácidos constitutivos de proteínas sino también aminoácidos no constitutivos de proteínas, tales como variantes de aminoácidos y derivados. Los expertos en la materia reconocerán a la luz de esta amplia definición que los ejemplos de un aminoácido en el presente documento incluyen L-aminoácidos constitutivos de proteínas; D-aminoácidos; aminoácidos químicamente modificados, tales como variantes de aminoácidos y derivados; aminoácidos no constitutivos de proteínas tales como norleucina,  $\beta$ -alanina y ornitina; así como compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades bien conocidas en la técnica que son características de los aminoácidos. Ejemplos de aminoácidos no constitutivos de proteínas incluyen  $\alpha$ -metilaminoácidos (como  $\alpha$ -metilalanina), D-aminoácidos, aminoácidos de tipo histidina (como 2-amino-histidina,  $\beta$ -hidroxi-histidina, homohistidina,  $\alpha$ -fluorometil-histidina y  $\alpha$ -metil-histidina), aminoácidos que tienen exceso de metileno en la cadena lateral (aminoácidos "homo") y aminoácidos que tienen el aminoácido del grupo funcional carboxilato en la cadena lateral sustituido por un grupo sulfonato (como el ácido cisteico). En un aspecto preferido de la presente invención, los aminoácidos empleados en el presente documento pueden ser aminoácidos constitutivos de proteínas.

**[0041]** Un residuo de aminoácido polar como se usa en el presente documento no está particularmente limitado siempre que sea un residuo de aminoácido cuya cadena lateral puede tener polaridad, ejemplos de los cuales incluyen residuos de aminoácidos ácidos y residuos de aminoácidos básicos. Ejemplos de un residuo de aminoácido ácido como se usa en este documento incluyen un residuo de ácido aspártico (Asp: D) y ácido glutámico (Glu: E), y ejemplos de un aminoácido básico incluyen arginina (Arg: R), lisina (Lys: K), e histidina (His: H).

**[0042]** Nótese que, por ejemplo, las representaciones tales como "ácido aspártico (Asp: D)" como se usa en este documento significa que una representación de tres letras "Asp" y una representación de una letra "D" se pueden emplear como abreviaturas de ácido aspártico.

**[0043]** Además, en la presente especificación, entre los residuos de aminoácidos neutros, los residuos de aminoácidos que comprenden un grupo hidroxilo, un grupo amida de ácido, un grupo tiol y similares se incluyen en los residuos de aminoácidos polares como aquellos que tienen polaridad. Por ejemplo, en la presente especificación, tirosina (Tyr: Y), serina (Ser: S), treonina (Thr: T), asparagina (Asn: N), glutamina (Gln: Q), cisteína (Cys: C) están incluidos en los residuos de aminoácidos polares.

**[0044]** Un residuo de aminoácido no polar como se usa en este documento no está particularmente limitado siempre que sea un aminoácido cuya cadena lateral no tiene polaridad, cuyos ejemplos incluyen alanina (Ala: A), valina (Val: V), leucina (Leu: L), isoleucina (Ile: I), metionina (Met: M), fenilalanina (Phe: F), triptófano (Trp: W), glicina (Gly: G) y prolina (Pro: P).

**[0045]** En el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención, "una secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos polares y no polares están dispuestos alternativamente" es preferiblemente aquella donde dicha secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia repetitiva "RADA" (2-8 repeticiones, preferiblemente 3-6 repeticiones) o una secuencia repetitiva "RATARAEA" (1-4 repeticiones, preferiblemente 2-3 repeticiones), y más preferiblemente donde dicha secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RADARADARADARADA (ID SEQ NO. 1), RADARADARADARADARADA (SEQ ID NO. 2) y RATARAEARATARAEA (SEQ ID. NO 3).

**[0046]** Una "cadena de azúcar" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto formado por una cadena de uno o más azúcares unitarios (monosacáridos y/o derivados de los mismos). Cuando se trata de una cadena de dos azúcares unitarios, cada unidad de azúcar está unida entre sí por una condensación de deshidratación por un enlace glucósido. Ejemplos de dicha cadena de azúcar incluyen, entre otros, un amplio rango, como monosacáridos y polisacáridos contenidos *in vivo* (glucosa, galactosa, manosa, fucosa, xilosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico y complejos derivados de la misma), así como las cadenas de azúcar que se degradaron o indujeron a partir de biomoléculas complejas como los polisacáridos, glicoproteínas, proteoglicanos, glucosaminoglicanos y glucolípidos degradados. La cadena de azúcar puede ser lineal o ramificada.

**[0047]** Una "cadena de azúcar" como se usa en este documento también incluye derivados de cadena de azúcar. Ejemplos de un derivado de cadena de azúcar incluyen, pero no se limitan a, cadenas de azúcar en las que el azúcar que configura la cadena de azúcar es, por ejemplo, un azúcar que posee un grupo carboxi (por ejemplo, ácido aldónico en donde la posición C-1 se oxida para convertirse en un ácido carboxílico ( como el ácido D-glucónico que se oxida D-glucosa) y el ácido urónico en donde el átomo C terminal se convirtió en un ácido carboxílico (ácido D-glucurónico que se oxida D-glucosa), un azúcar que posee un grupo amino o un grupo amino derivado (como D-glucosamina y D-galactosamina), un azúcar que posee grupos amino y carboxi (como el ácido N-glicoilneuramínico y ácido N-acetilmurámico), un azúcar desoxilado (como el 2-desoxi-D-ribosa), un azúcar sulfatado que comprende un grupo sulfato, y un azúcar fosforilado que comprende un grupo fosfato.

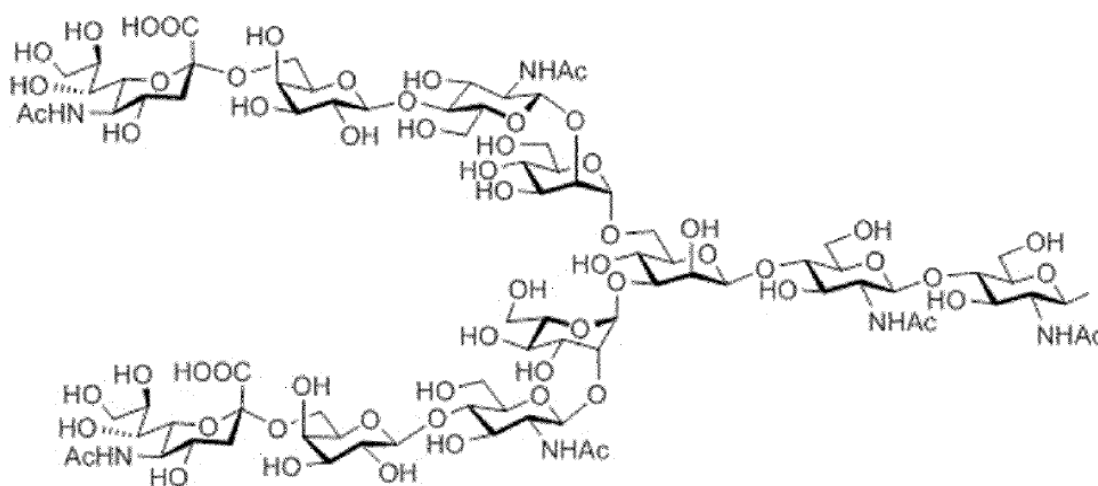
**[0048]** En el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención, la cadena de azúcar para unirse al polipéptido no está particularmente limitada, pero es preferiblemente una cadena de

azúcar que existe *in vivo* como un glicoconjugado (tal como un glucopéptido (o una glicoproteína), un proteoglicano y un glicolípido) con respecto a la biocompatibilidad. Dichas cadenas de azúcar incluyen cadenas de azúcar unidas a N, cadenas de azúcar unidas a O, y similares, que son cadenas de azúcar que están unidas *in vivo* a péptidos (o proteínas) como glico péptidos (o glicoproteínas).

5 [0049] En el complejo de cadena de azúcar-polipéptido según la presente invención, por ejemplo, se puede emplear una cadena de azúcar disialo, una cadena de azúcar asialo, una cadena de azúcar diGlcNAc, una cadena de azúcar dimanosa (DiMan), una cadena de azúcar GlcNAc, una cadena de azúcar maltotriosa, una cadena de azúcar de maltosa, una cadena de azúcar de maltotetraosa, una cadena de azúcar de maltoheptaosa, una cadena de azúcar de  $\beta$ -ciclodextrina y una cadena de azúcar de  $\gamma$ -ciclodextrina para que  
10 la cadena de azúcar se una al polipéptido.

[0050] Más específicamente, la cadena de azúcar empleada en la presente invención puede ser una cadena de azúcar disialo mostrada por la siguiente Fórmula (1), una cadena de azúcar asialo mostrada por la siguiente Fórmula (2), una cadena de azúcar diGlcNAc mostrada por la siguiente Fórmula (3), una cadena de azúcar dimanosa mostrada por la siguiente Fórmula (4), una cadena de azúcar GlcNAc mostrada por la siguiente  
15 Fórmula (5), una cadena de azúcar maltotriosa mostrada por la siguiente Fórmula (6), una cadena de azúcar maltosa mostrada por la siguiente Fórmula (7), una cadena de azúcar maltotetraosa mostrada por la siguiente Fórmula (8), una cadena de azúcar maltoheptaosa mostrada por la siguiente Fórmula (9), una cadena de azúcar  $\beta$ -ciclodextrina mostrada por la siguiente Fórmula (10), o una cadena de azúcar de  $\gamma$ -ciclodextrina mostrada por la siguiente Fórmula (10-2).

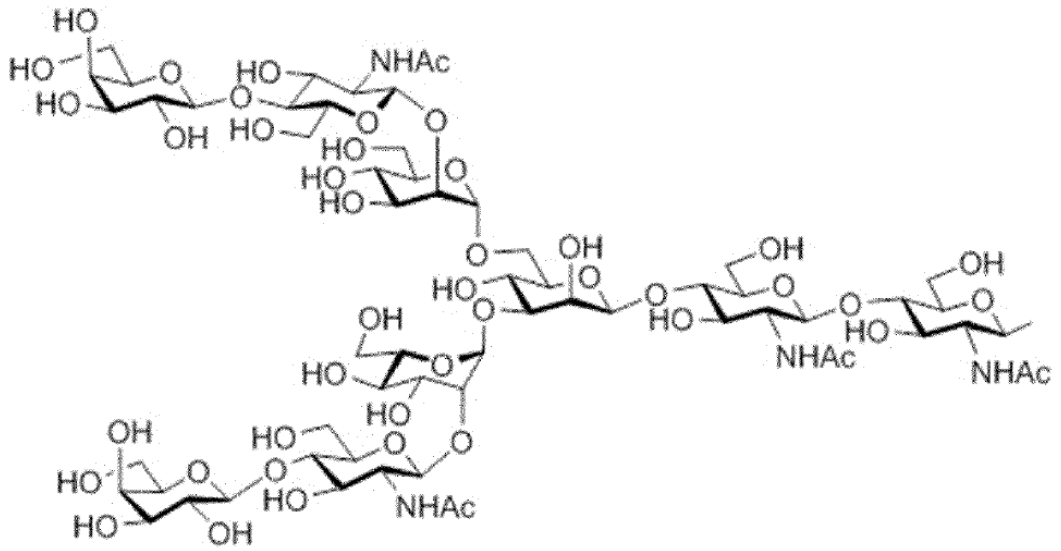
[Fórmula Química 1]



Fórmula (1) Cadena de azúcar disialo

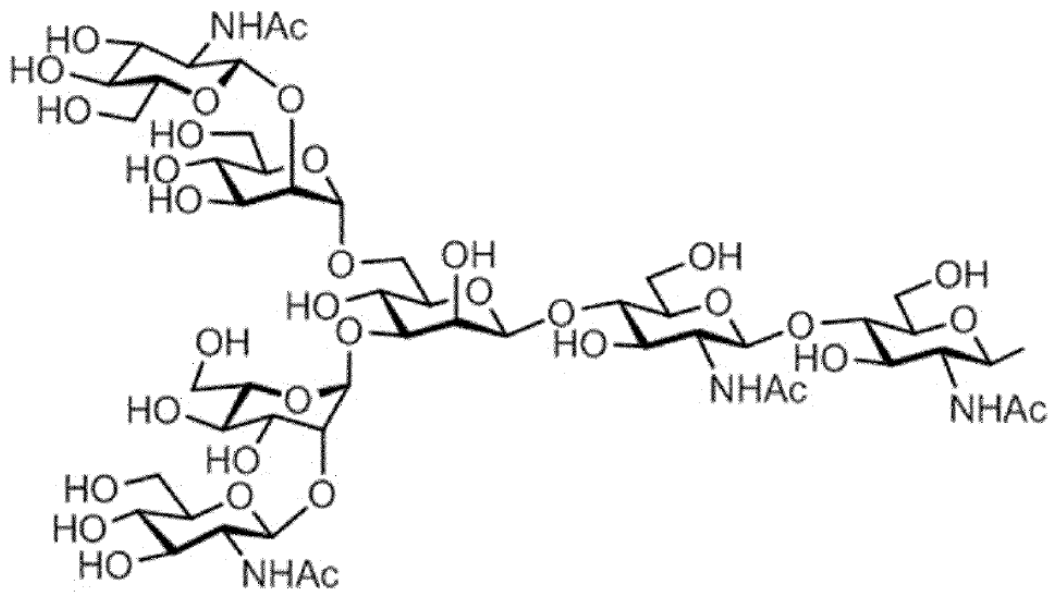
20

[Fórmula Química 2]



1) Fórmula (2) Cadena de azúcar asialo

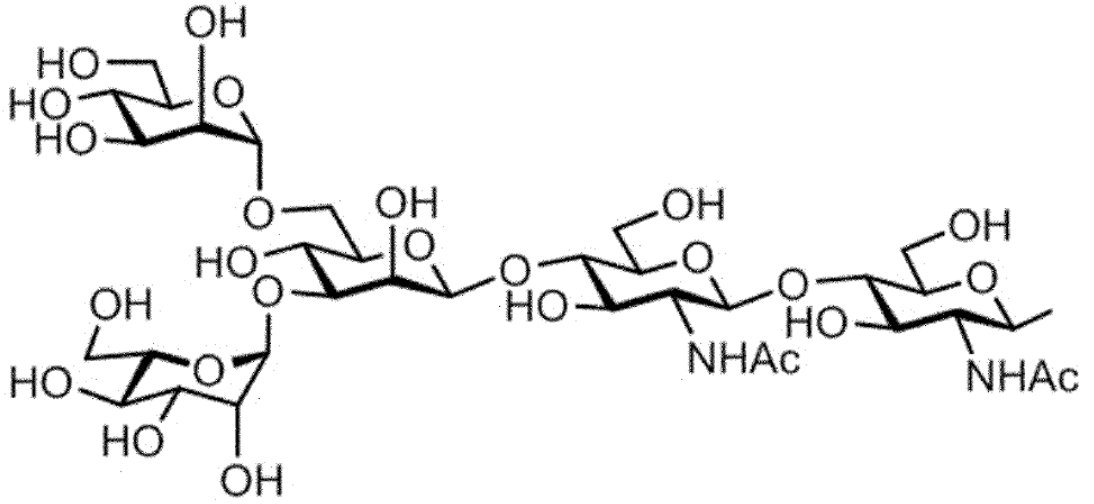
[Fórmula Química 3]



Fórmula (3) Cadena de azúcar DiGlcNAc

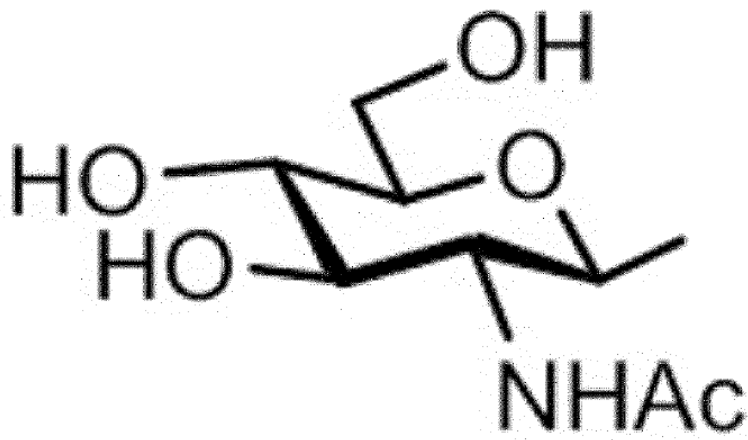


[Fórmula Química 4]



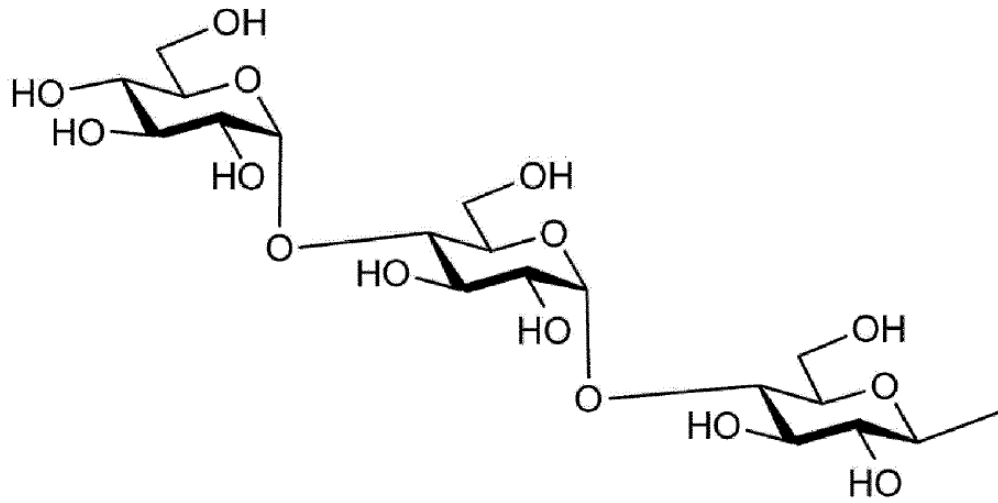
Fórmula (4) cadena de azúcar dimanosa

[Fórmula Química 5]



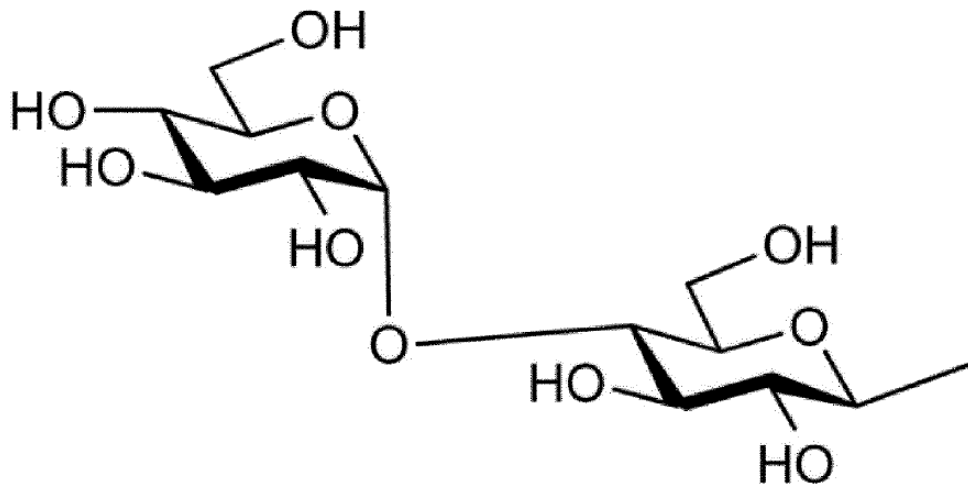
Fórmula (5) cadena de azúcar GlcNAc

[Fórmula Química 6]



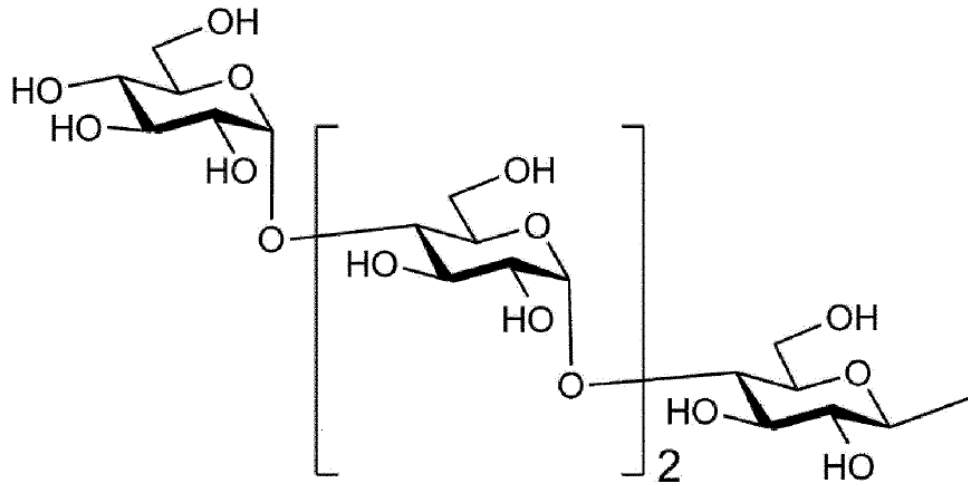
Fórmula (6) Cadena de azúcar maltotriosa

[Fórmula Química 7]



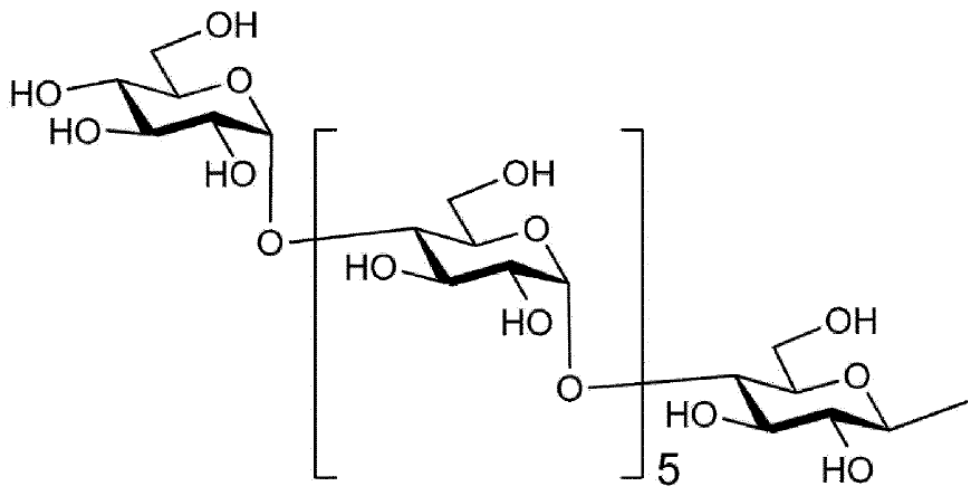
Fórmula (7) Cadena de azúcar maltosa

[Fórmula Química 8]



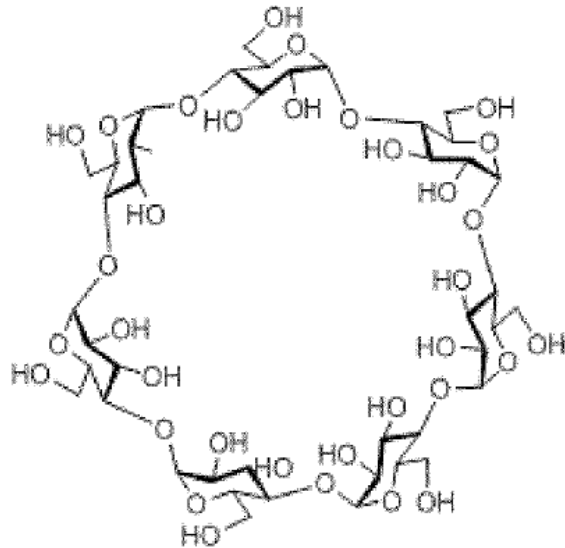
Fórmula (8) Cadena de azúcar maltotetraosa

[Fórmula Química 9]



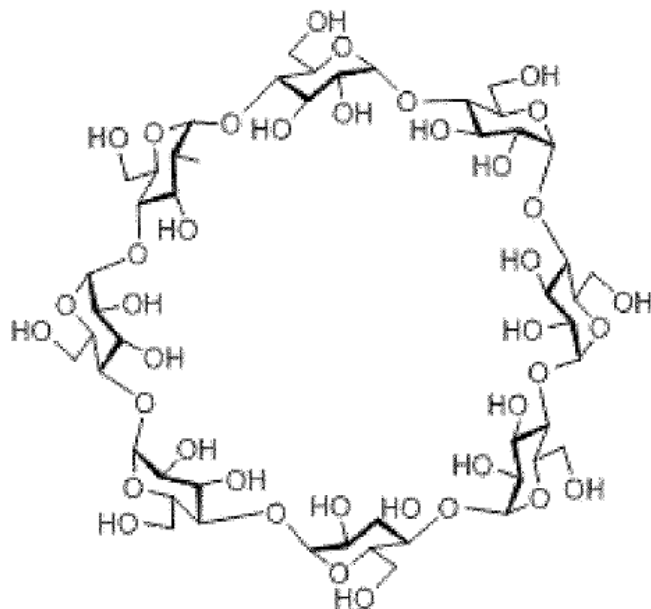
Fórmula (9) Cadena de azúcar maltoheptaosa

[Fórmula Química 10]



Fórmula (10) Cadena de azúcar  $\beta$ -ciclodextrina

[Fórmula Química 11]



Fórmula (10-2) Cadena de azúcar  $\gamma$ -ciclodextrina

**[0051]** En la presente invención, también puede emplearse una cadena de azúcar en la que uno o más azúcares se pierden del terminal no reductor de la cadena de azúcar disialo, cadena de azúcar asialo, cadena de azúcar diGlcNAc, cadena de azúcar dimanosa o cadena de azúcar maltoheptaosa anterior.

5 **[0052]** En la presente invención, el residuo de aminoácido al que está unida una cadena de azúcar no está particularmente limitado. Por ejemplo, una cadena de azúcar puede unirse a cisteína (Cys: C) o asparagina (Asn: N), preferiblemente a cisteína (Cys: C).

**[0053]** En la presente invención, el método para unir una cadena de azúcar a un aminoácido no está particularmente limitado. Por ejemplo, una cadena de azúcar puede unirse directamente a un residuo de aminoácido, o una cadena de azúcar puede unirse a un residuo de aminoácido a través de un enlazador.

10 **[0054]** Además, en la presente invención, el residuo de aminoácido al que está unida una cadena de azúcar se puede unir directamente a "una secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos polares y no polares están alternativamente dispuestos", o se puede unir a través de, por ejemplo, un enlazador.

**[0055]** Ejemplos de dicho enlazador pueden incluir una cadena de alquilo o una cadena de PEG que posee grupos amino y carboxi en ambos extremos, de modo que puede formar enlaces peptídicos con un aminoácido. Ejemplos de dicho enlazador pueden incluir  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$  (en donde n es un número entero y no está limitado siempre que no inhiba la función de enlace de interés, preferiblemente un número entero 1-15) o  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-$  (donde m es un número entero y no está limitado siempre y cuando no inhiba la función de enlace de interés, preferiblemente un número entero 1-7), más específicamente  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CO}-$  (enlazador C12) o  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}-$  (enlazador PEG) y similares.

20 **[0056]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención se puede fabricar integrando una etapa de glicosilación en un método de síntesis de polipéptidos bien conocido por los expertos en la técnica. Aunque se puede emplear un método que utiliza una enzima representada por la transglutaminasa para la glicosilación, existen problemas en este caso, como la necesidad de agregar una gran cantidad de la cadena de azúcar, la complicación de la purificación después de la etapa final y las limitaciones en las posiciones de glicosilación y cadenas de azúcar que se pueden agregar. Como resultado, aunque es posible emplear esto en una síntesis a pequeña escala como en los ensayos, no se puede decir que sea un método práctico para una fabricación a gran escala.

25 **[0057]** Como ejemplos específicos de un método de fácil fabricación del complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención, un método para fabricar un complejo de cadena de azúcar-polipéptido usando Asn que tiene una cadena de azúcar unida (Asn glicosilada) y aplicando un método conocido de síntesis de péptidos, como la síntesis en fase sólida y líquida (Método A), y un método para fabricar un complejo de cadena de azúcar-polipéptido mediante la fabricación de un polipéptido en donde un residuo de aminoácido arbitrario es Cys de acuerdo con un método de síntesis de péptidos bien conocido y, a continuación, se ilustrará la glicosilación de Cys por síntesis química (Método B). Los expertos en la materia podrán fabricar complejos de polipéptidos de cadena de azúcar mediante diversos métodos haciendo referencia a estos métodos de fabricación.

30 **[0058]** Estos métodos A y B también se pueden llevar a cabo en una combinación de dos o más. En el caso de una síntesis a pequeña escala empleada para ensayos, etc., el método anterior puede usarse adicionalmente en combinación con una reacción de elongación de la cadena de azúcar por una transferasa. El Método A se describe en la Publicación Internacional No. 2004/005330 (US2005222382 (A1)) y el Método B se describe en la Publicación Internacional No. 2005/010053 (US2007060543 (A1)). Además, la fabricación de cadenas de azúcar que tienen una estructura de cadena de azúcar uniforme empleada en los Métodos A y B se describe en, por ejemplo, Publicación Internacional No. 03/008431 (US2004181054 (A1)), Publicación Internacional No. 2004/058984 (US2006228784 (A1)), Publicación Internacional No. 2004/058824 (US2006009421 (A1)), Publicación Internacional No. 2004/070046 (US2006205039 (A1)), y la Publicación Internacional No. 2007/011055.

#### Método para fabricar un complejo de cadena de azúcar-polipéptido (Método A)

**[0059]** Como se describe a continuación, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido se puede fabricar, por ejemplo, por síntesis en fase sólida empleando Asn que tiene una cadena de azúcar unida a la misma.

50 (1) El grupo carboxi de un aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo está unido a una resina. En este caso, dado que el grupo amino de nitrógeno del aminoácido está protegido con un grupo protector lipófilo, se evita la autocondensación de los aminoácidos entre sí, y la resina y el aminoácido reaccionan para formar un enlace.

(2) El grupo protector lipófilo del reactivo obtenido se separa para formar un grupo amino libre.

55 (3) Este grupo amino libre y el grupo carboxi de cualquier aminoácido que tenga el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo se someten a una reacción de amidación.

(4) El grupo protector lipófilo anterior se separa para formar un grupo amino libre.

(5) Los pasos (3) y (4) anteriores se repiten una o más veces para producir un péptido de cualquier número de aminoácidos unidos entre sí, con una resina unida en un extremo y que posee un grupo amino libre en el otro extremo.

5 (6) Cuando el grupo amino libre del péptido sintetizado en el párrafo (5) anterior debe protegerse con un grupo acetilo, también se prefiere acetilar con anhídrido acético, ácido acético y similares.

(7) Finalmente, la resina se escinde con un ácido y se puede obtener un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos deseada.

10 **[0060]** En este caso, empleando un Asn glicosilado que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo, y haciendo reaccionar el grupo carboxi de dicho resto asparagina con el hidroxilo en el grupo de la resina en (1), se puede obtener un péptido que posee una Asn glicosilada en el extremo C-terminal.

15 **[0061]** Además, después de (2), o después de repetir (3) y (4) por un número de veces o más, empleando un Asn glicosilado que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo en (3), una cadena de azúcar puede unirse en cualquier posición del polipéptido.

**[0062]** De esta manera, empleando un Asn glicosilado que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo dos o más veces en cualquiera de las etapas (1) y (3), las cadenas de azúcar se pueden unir en dos o más posiciones del polipéptido.

20 **[0063]** Si, después de unirse a la Asn glicosilada, el grupo protector lipófilo se separa y se forma un grupo amino libre, y la etapa (7) se lleva a cabo inmediatamente después, se puede obtener un polipéptido que posee una Asn glicosilada en el extremo N-terminal.

25 **[0064]** Una resina que proporciona el C-C-terminal como un grupo amida puede ser una resina utilizada habitualmente en la síntesis en fase sólida. Por ejemplo, se prefiere emplear resina de amida de Rink que está funcionalizada con un grupo amino (de Merck & Co., Inc.), resina de PEGA Rink-Amida (de Merck & Co., Inc.) o resina NH-SAL (de Watanabe Chemical Industries, Ltd.). Además, el enlazador de resina Fmoc-NH-SAL (de Watanabe Chemical Industries, Ltd.) y similares pueden unirse a la resina Amino-PEGA que está funcionalizada con un grupo amino (de Merck & Co., Inc.) y similares. El aminoácido C-terminal del péptido puede amidarse escindiendo esta resina y el péptido con un ácido.

30 **[0065]** Además, los ejemplos de una resina que hace que el C-terminal sea un ácido carboxílico que puede emplearse son la resina de cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con cloro (de Merck & Co., Inc.), la resina amino-PEGA funcionalizada con un amino grupo (de Merck & Co., Inc.), resina de alcohol NovaSyn TGT que posee un grupo hidroxilo (de Merck & Co., Inc.), resina de Wang (de Merck & Co., Inc.), resina HMPA-PEGA (de Merck & Co., Inc.), y similares. Además, un enlazador puede estar presente entre la resina amino-PEGA y el aminoácido, y los ejemplos de dicho enlazador pueden incluir ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA), ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butilacético (HMPB), y similares. También se puede emplear una resina H-Cys(Trt)-Tritil Nova PEG en la que el aminoácido C-terminal está unido a una resina por adelantado (de Merck & Co., Inc.) y similares.

40 **[0066]** En lo que respecta a la unión entre una resina y un aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo, por ejemplo, para usar una resina que posee un grupo hidroxilo o una resina funcionalizada con cloro, el grupo carboxi del aminoácido se somete a una unión de éster con la resina. Además, cuando se emplea una resina funcionalizada con un grupo amino, el grupo carboxi del aminoácido está unido a la resina por un enlace amida.

45 **[0067]** Nótese que la resina de cloruro de 2-clorotritilo se prefiere porque puede prevenir la racemización de Cys C-terminal cuando se alarga la cadena peptídica en la síntesis en fase sólida.

Método para fabricar un complejo de cadena de azúcar-polipéptido - 2 (Método A)

**[0068]** Como se describe a continuación, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido puede fabricarse, por ejemplo, por síntesis en fase líquida empleando Asn que tiene una cadena de azúcar unida a la misma.

50 (1) El grupo carboxi de un aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo está unido a un aminoácido que tiene el grupo amino libre y el grupo carboxi protegido o amidado.

(2) El grupo protector lipófilo del reactivo obtenido se separa para formar un grupo amino libre.

55 (3) Este grupo amino libre y el grupo carboxi de cualquier aminoácido que tenga el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo se someten a una reacción de amidación en solución. En este caso, dado que el grupo amino del nitrógeno del aminoácido en el lado N-terminal está protegido con un grupo protector lipófilo y el grupo carboxi en el lado C-terminal está protegido o amidado, la

autocondensación de los aminoácidos entre sí se evita, el grupo amino libre y el grupo carboxi reaccionan para formar un enlace.

(4) El grupo protector lipófilo anterior se separa para formar un grupo amino libre.

5 (5) Los pasos (3) y (4) anteriores se repiten una o más veces para producir un péptido de cualquier número de aminoácidos unidos, con el grupo carboxi C-terminal protegido o amidado y que posee un grupo amino libre en la N-terminal.

(6) Cuando el grupo amino libre del péptido sintetizado en el párrafo (5) anterior debe protegerse con un grupo acetilo, también se prefiere acetilar con anhídrido acético, ácido acético y similares.

10 (7) Finalmente, el grupo protector lipófilo de cadena lateral se escinde con un ácido y se puede obtener un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos deseada.

#### Método para la fabricación de un complejo de cadena de azúcar-polipéptido - 3 (Método A)

**[0069]** Como se describe a continuación, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido se puede fabricar, por ejemplo, por un método de síntesis de fragmentos empleando Asn que tiene una cadena de azúcar unida al mismo.

15 (1) Un polipéptido o un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo acetilo o un grupo protector lipófilo se sintetiza en una resina mediante (1)-(6) del método anterior para fabricar un azúcar complejo cadena de polipéptido (Método A).

20 (2) El polipéptido o el complejo de cadena de azúcar-polipéptido se escinde de la resina en condiciones que no desprotegen el grupo protector de cadena lateral para obtener un polipéptido o el complejo de cadena de azúcar-polipéptido que posee un carboxi libre en el extremo C-terminal y tener el nitrógeno del grupo amino en el extremo N-terminal está protegido con un grupo acetilo o un grupo protector lipófilo.

(3) El polipéptido o el complejo de cadena de azúcar-polipéptido obtenido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo acetilo o un grupo protector lipófilo está unido a una resina o un polipéptido por síntesis en fase sólida o líquida.

25 (4) El grupo protector lipófilo anterior se separa para formar un grupo amino libre.

(5) Los pasos anteriores (3) y (4) se repiten una o más veces para producir un péptido de cualquier número de aminoácidos unidos entre sí.

(6) Finalmente, la resina se escinde con un ácido y se puede obtener un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos deseada.

30 **[0070]** Ejemplos de un grupo protector lipófilo pueden incluir un grupo protector basado en carbonato o amida y similares, tales como un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), un grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), un grupo bencilo, un grupo alilo, un grupo aliloxicarbonilo y un grupo acetilo. Con el fin de introducir un grupo protector lipófilo en un aminoácido, por ejemplo, para introducir un grupo Fmoc, la introducción se puede llevar a cabo agregando carbonato de 9-fluorenilmetil-N-succinimidilo e hidrogenocarbonato de sodio y dejando reaccionar.

35 La reacción se puede llevar a cabo a 0-50°C, preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente 1-5 horas.

**[0071]** También se pueden usar los disponibles en el mercado como el aminoácido protegido con un grupo protector lipófilo, cuyos ejemplos pueden incluir Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Tyr-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys-OH, Fmoc-Arg-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Cys-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp-OH y Fmoc-Pro-OH.

40

**[0072]** Además, los ejemplos del aminoácido protegido con un grupo protector lipófilo que tiene un grupo protector introducido en la cadena lateral pueden incluir Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Cys(StBu)-OH, Fmoc-Cys(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, y Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

45

**[0073]** Además, cuando se desea agregar un enlazador en la secuencia de aminoácidos del conjugado polipéptido de cadena de azúcar, se puede insertar un enlazador en una posición preferida usando un enlazador protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido anterior protegido con un grupo protector lipófilo en el proceso de síntesis en fase sólida.

50

**[0074]** Cuando se emplea una resina de cloruro de 2-clorotritilo, la esterificación puede llevarse a cabo empleando una base tal como diisopropiletilamina (DIPEA), trietilamina, piridina y 2,4,6-colidina. Además, cuando se emplea una resina que posee un grupo hidroxilo, por ejemplo, agentes de condensación de deshidratación bien conocidos, tales como 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), dicitohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIC) puede emplearse como catalizador de esterificación. La proporción de uso entre el aminoácido y el agente de condensación de deshidratación es de 1 equivalente del primero a ordinariamente 1-10 equivalente, preferiblemente 2-5 equivalentes del último.

55

5 **[0075]** La reacción de esterificación se lleva a cabo preferiblemente, por ejemplo, colocando una resina en una columna de fase sólida, lavar esta resina con un solvente y luego agregar una solución de aminoácidos. Ejemplos de un disolvente de lavado pueden incluir dimetilformamida (DMF), 2-propanol, diclorometano y similares. Ejemplos de un disolvente para disolver aminoácidos pueden incluir dimetilsulfóxido (DMSO), DMF, diclorometano y similares. La reacción de esterificación se puede llevar a cabo a 0-50°C, preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos-30 horas, preferiblemente 15 minutos-24 horas.

**[0076]** También se prefiere en este momento proteger los grupos sin reaccionar en la fase sólida mediante acetilación con anhídrido acético, etc.

10 **[0077]** El desprendimiento del grupo protector lipófilo se puede llevar a cabo, por ejemplo, por tratamiento con una base. Ejemplos de una base pueden incluir piperidina, morfina y similares. Se prefiere hacerlo en presencia de un disolvente. Ejemplos de un disolvente pueden incluir DMSO, DMF, metanol y similares.

**[0078]** La reacción de amidación entre el grupo amino libre y el grupo carboxi de cualquier aminoácido que tiene el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un activador y un disolvente.

15 **[0079]** Ejemplos de un activador pueden incluir dicitohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida sal de hidrocloreuro (WSC/HCl), difenilfosforilazida (DPPA), carbonildiimidazol (CDI), difenilfosforilazida (DPPA), carbonildiimidazol (CDI), dietilcianofosfonato (DEPC), benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidinofosfonio (DIPCI), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidinofosfonio (PyBOP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hidroxisuccinimida (HOSu), dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), hidroxiftalimida (HOPht), pentafluorofenol (Pfp-OH), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazol-3-óxido hexafluorofosfato (HCTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), 3,4-dihidro-3-hidrodi-4-oxa-1,2,3-benzotriazina (Dhbt), 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio cloruro n-hidrato (DMT-MM), y similares.

20

25

**[0080]** Se prefiere que la cantidad del activador usado sea de 1-20 equivalentes, preferiblemente de 1-10 equivalentes, y más preferiblemente de 1-5 equivalentes a cualquier aminoácido que tenga el nitrógeno del grupo amino protegido con un grupo protector lipófilo.

30 **[0081]** Ejemplos de un disolvente pueden incluir DMSO, DMF, diclorometano y similares. La reacción se puede llevar a cabo a 0-50°C, preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos-30 horas, preferiblemente durante 15 minutos-24 horas. El desprendimiento del grupo protector lipófilo se puede llevar a cabo de manera similar a la anterior.

35 **[0082]** Cuando se introduce un aminoácido C-terminal a la resina de amina Rink funcionalizada con un grupo amino (de Merck & Co., Inc.), la resina de PEGA Rink-Amida (de Merck & Co., Inc.), la resina NH-SAL (de Watanabe Chemical Industries, Ltd.), o la resina amino-PEGA unida al enlazador de resina NH-SAL (de Merck & Co., Inc.) y similares, la introducción puede llevarse a cabo empleando la reacción de amidación anterior.

**[0083]** Se prefiere el tratamiento con un ácido para escindir la cadena peptídica de la resina. Ejemplos de un ácido pueden incluir ácido trifluoroacético (TFA), fluoruro de hidrógeno (HF) y similares.

40 **[0084]** De esta manera, se puede obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que posee una Asn glicosilada en la posición deseada.

45 **[0085]** En una realización de la presente invención, cuando el terminal no reductor en la cadena de azúcar en la Asn glicosilada empleada para la síntesis en fase sólida comprende un ácido siálico, se prefiere que el grupo carboxi de dicho ácido siálico esté protegido por un grupo protector para evitar que el ácido siálico sea escindido por el tratamiento con ácido. Ejemplos de un grupo protector pueden incluir un grupo bencilo, un grupo alilo, un grupo difenilmetilo, un grupo fenacilo y similares. El método para introducir el grupo protector y separar el grupo protector se puede llevar a cabo mediante un método bien conocido.

#### Método para fabricar un complejo de cadena de azúcar-polipéptido (Método B)

50 **[0086]** El complejo de cadena de azúcar-polipéptido también se puede fabricar mediante un método para sintetizar primero un polipéptido, y luego glicosilar el polipéptido sintetizado. Específicamente, un polipéptido que comprende Cys en la posición que se va a glicosilar se fabrica mediante el método de síntesis en fase sólida o líquida, un método de síntesis por células, un método para separar y extraer aquellos que ocurren en la naturaleza y similares. Cuando el polipéptido se sintetiza mediante un método de síntesis en fase sólida o líquida, los aminoácidos se pueden unir un residuo a la vez, o se puede vincular un polipéptido. La Cys que no debe estar glicosilada, tal como Cys en la posición predeterminada para formar un enlace disulfuro, se protege aquí con, por ejemplo, un grupo acetoamidometilo (Acm). Además, cuando se introduce Cys que no debe estar glicosilado y no se usa para formar un enlace disulfuro en el complejo de cadena de azúcar-polipéptido, se

55



puede introducir protegiendo el Cys con un grupo protector durante la etapa de glicosilación y la etapa de formación del enlace disulfuro, y luego desprotegerlo. Ejemplos de dicho grupo protector pueden incluir tert-butilo (tBu) o 4-metoxibencilo y similares.

5 **[0087]** Además, cuando se agregan diferentes cadenas de azúcar a Cys en un polipéptido, pueden introducirse diferentes cadenas de azúcar haciendo que la Cys para introducir una cadena de azúcar primero no esté protegida, y protegiendo a la Cys para introducir la siguiente cadena de azúcar por StBu y similares. Específicamente, al sintetizar el polipéptido por síntesis en fase sólida, etc., la Cys para introducir una primera cadena de azúcar se vuelve desprotegida y la Cys para introducir una segunda cadena de azúcar se convierte en Cys que posee un grupo protector con Fmoc-Cys(StBu)-OH etc. Luego, se introduce una cadena de azúcar en la Cys desprotegida, mientras que se retiene todavía el grupo protector tal como StBu. Luego se puede introducir una cadena de azúcar diferente en el Cys desprotegido desprotegiendo el grupo StBu, etc. La Cys para introducir la primera cadena de azúcar y la Cys para introducir la segunda cadena de azúcar puede ser una o más.

15 **[0088]** La desprotección del grupo StBu se puede llevar a cabo sometiendo a una reacción con un reductor tal como sal de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT) y tributilfosfina. La reacción anterior se puede llevar a cabo normalmente a 0-80°C, preferiblemente a 5-60°C, y más preferiblemente a 10-35°C. Preferiblemente, el tiempo de reacción es generalmente de aproximadamente 30 minutos-5 horas. Una vez completada la reacción, puede purificarse con un método bien conocido (como la cromatografía en columna líquida de alto rendimiento (HPLC)) según sea apropiado.

20 **[0089]** Cuando se introducen diferentes cadenas de azúcar, se prefiere comenzar la introducción con una cadena de azúcar que sea más estable frente a la condición de reducción en la etapa de desprotección de Cys o la condición ácida en la etapa de purificación, tal como HPLC. En particular, cuando se introduce una cadena de azúcar que contiene ácido siálico, se prefiere que primero se introduzca una cadena de azúcar que no posea un ácido siálico o una cadena de azúcar con menos residuos de ácido siálico.

25 **[0090]** Además, cuando se desea agregar un enlazador en la secuencia de aminoácidos del complejo de cadena de azúcar-polipéptido, se puede insertar un enlazador en una posición preferida del polipéptido sintetizado, por ejemplo, utilizando un enlazador protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido protegido con un grupo protector lipófilo en el proceso de síntesis en fase sólida.

30 **[0091]** A continuación, haciendo reaccionar un derivado de cadena de azúcar haloacetilado con el péptido que comprende una Cys desprotegida obtenida anteriormente, la cadena de azúcar reacciona con el grupo tiol de la Cys desprotegida y se une al péptido. La reacción anterior se puede llevar a cabo en un regulador de fosfato, un regulador de tris-clorhidrato, un regulador de citrato o una solución mixta de los mismos, generalmente a 0-80°C, preferiblemente a 10-60°C, y aún más preferiblemente a 15-35°C. Preferiblemente, el tiempo de reacción es generalmente de 10 minutos-24 horas, y preferiblemente de aproximadamente 30 minutos-5 horas. Una vez completada la reacción, esta puede purificarse con un método bien conocido (tal como HPLC) según sea apropiado.

40 **[0092]** Un ejemplo de un derivado de cadena de azúcar haloacetilado es un compuesto que tiene el grupo hidroxilo unido al carbono en la posición 1 de una cadena de azúcar unida a asparagina sustituida con  $-NH-(CH_2)_a-(CO)-CH_2X$  (en donde X es un átomo de halógeno y a es un número entero y no está limitado siempre que no inhiba la función de enlace de interés, preferiblemente un número entero de 0-4).

**[0093]** Específicamente, el complejo haloacetilado derivado de cadena de azúcar y el polipéptido que contiene Cys se hacen reaccionar en un regulador de fosfato a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido que posee una Cys que tiene una cadena de azúcar unida al mismo se puede obtener mediante purificación con HPLC.

45 **[0094]** La reacción también se puede llevar a cabo en una solución mixta de un disolvente orgánico tal como DMSO, DMF, metanol y acetonitrilo con el regulador anterior. En este caso, el solvente orgánico se puede agregar al regulador anterior en una proporción en el rango de 0-99 % (v/v). Esto se prefiere para un péptido que comprende Cys desprotegido con baja solubilidad frente al regulador porque la adición de dicho disolvente orgánico puede mejorar la solubilidad frente a la solución de reacción.

50 **[0095]** La reacción también se puede llevar a cabo en un disolvente orgánico tal como DMSO, DMF, metanol y acetonitrilo o una solución mixta de los mismos. Se prefiere hacerlo en presencia de una base. Ejemplos de una base pueden incluir DIPEA, trietilamina, piridina, 2,4,6-colidina y similares. La reacción también se puede llevar a cabo en una solución mixta de clorhidrato de guanidina o urea añadida a la solución reguladora. El clorhidrato de guanidina o la urea se pueden agregar al regulador anterior, de modo que la concentración final será de 1 M-8 M. Esto se prefiere porque la adición de clorhidrato de guanidina o urea también puede mejorar la solubilidad de un péptido con baja solubilidad frente al regulador.

55 **[0096]** Además, la reacción también puede llevarse a cabo con la adición de sal de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o ditioneitol (DTT) al regulador para evitar la formación de un dímero de polipéptidos

que comprende Cys no protegido a través de enlace disulfuro. Se puede agregar TCEP o DTT al regulador para que la concentración final sea de 10  $\mu$ M-10 mM.

5 **[0097]** Además, después de que la cadena de azúcar se une a la Cys objetivo, el grupo protector de Cys protegido con Acm y similares se desprotege. Cuando el grupo protector es un grupo Acm, la desprotección puede llevarse a cabo permitiendo la reacción con yodo, acetato de mercurio (II), nitrato de plata (I) o acetato de plata (I) y similares en agua, metanol, ácido acético o una solución mixta de los mismos.

10 **[0098]** La reacción anterior puede llevarse a cabo normalmente a 0-80°C, preferiblemente a 5-60°C, y más preferiblemente a 10-35°C. Preferiblemente, el tiempo de reacción es generalmente de aproximadamente 5 minutos-24 horas. Una vez completada la reacción, esta puede purificarse con un método bien conocido (tal como HPLC) según sea apropiado después del tratamiento con DTT o ácido clorhídrico y similares.

**[0099]** De esta manera, se puede obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que posee Cys que tiene una cadena de azúcar unida a él en la posición deseada. Además, como se describe a continuación, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido purificado como tal puede formar un enlace disulfuro entre la desprotección Cys.

15 **[0100]** Además, cuando se fabrica un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que posee múltiples cadenas de azúcar que contienen ácido siálico tales como cadenas de azúcar disialo o monosialo en la secuencia peptídica, se puede emplear una cadena de azúcar que contiene ácido siálico que tiene el grupo carboxi del ácido siálico en la secuencia peptídica sobre la cadena de azúcar que se va a introducir protegida con un grupo bencilo (Bn), un grupo alilo, un grupo difenilmetilo, un grupo fenacilo y similares.

20 **[0101]** Cuando se introduce una cadena de azúcar que tiene el grupo carboxi de la protección del ácido siálico, se puede llevar a cabo una etapa de desprotección del grupo protector del ácido siálico después de una etapa de formación de un enlace disulfuro en el complejo de cadena de azúcar-polipéptido descrito más adelante.

25 **[0102]** De esta manera, al proteger el grupo carboxi del ácido siálico con un grupo bencilo y similares, se facilitará la etapa de separación/purificación por HPLC, etc., en la etapa de fabricación. La protección del grupo carboxi del ácido siálico también permitirá la prevención del desprendimiento del ácido siálico lábil a ácidos.

30 **[0103]** La reacción de protección del grupo carboxi del ácido siálico en la cadena de azúcar se puede llevar a cabo mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica. Además, en el complejo de cadena de azúcar-polipéptido que ha formado un enlace disulfuro, el grupo protector del grupo carboxi del ácido siálico puede desprotegerse por hidrólisis en condiciones básicas. La reacción anterior se puede llevar a cabo normalmente a 0- 50°C, preferiblemente a 0-40°C, y aún más preferiblemente a 0-30°C. Preferiblemente, el tiempo de reacción es generalmente de aproximadamente 5 minutos-5 horas. Una vez completada la reacción, esta puede purificarse con un método bien conocido (tal como HPLC) según sea apropiado después de la neutralización con un ácido débil como ácido fosfórico o ácido acético.

35 **[0104]** Además, el complejo de cadena de azúcar-polipéptido creado por los Métodos A y B anteriores puede formar un enlace disulfuro entre Cys con un método bien conocido por los expertos en la técnica que emplean aire y/u oxígeno, yodo, DMSO, mezcla de glutatión oxidado y reducido, ferricianuro de potasio, reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)), trifluoroacetato de talio (III), sulfóxido de alquiltriclorosilano y similares.

40 **[0105]** Cuando se forma un enlace disulfuro entre Cys-Cys, el Cys en el complejo de cadena de azúcar-polipéptido que no se desea que forme un enlace disulfuro, está protegido por un grupo protector. Un grupo protector que es estable en condiciones oxidantes tales como Acm, tBu, 4-metoxibencilo y 4-metilbencilo puede emplearse como tal grupo protector.

45 **[0106]** En el Método B, la formación de un enlace disulfuro también se puede llevar a cabo antes de la introducción de la cadena de azúcar. Sin embargo, cuando se introduce un grupo protector en la Cys que se desea para formar un enlace disulfuro, la etapa de desprotección precederá a la etapa de formación del enlace disulfuro.

50 **[0107]** Además, en el Método B, el aminoácido que va a reaccionar con el complejo haloacetilado derivado de la cadena de azúcar no está particularmente limitado siempre que sea un aminoácido que contenga un grupo tiol, y por ejemplo, también pueden emplearse D-cisteína (D-Cys), homocisteína, norcisteína, penicilamina y similares de manera similar a Cys.

55 **[0108]** El tipo de cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado, pero se prefiere que el número total de residuos de azúcar presente en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido sea 5 o más. Por ejemplo, se pueden agregar una o más cadenas de azúcar que sean un pentasacárido o superior, o se pueden agregar múltiples cadenas de azúcar que sean un pentasacárido o inferior para que la cantidad de residuos de azúcar que esté presente en la cadena de azúcar agregada a una cadena de azúcar polipéptido complejo sea de 5 o

más. Cuando se agregan múltiples cadenas de azúcar, el tipo de cadena de azúcar unida a un péptido puede ser idéntico o pueden unirse en combinación diferentes tipos de cadenas de azúcar, pero es preferiblemente idéntico.

- 5 **[0109]** Por ejemplo, cuando el número total de residuos de azúcar presente en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido es 5, pueden unirse uno de cada una de una cadena de azúcar de maltosa posee dos residuos de azúcar y una cadena de azúcar de maltotriosa que posee tres residuos. Además, cuando el número total de residuos de azúcares presentes en la cadena de azúcar unida al complejo de la cadena de azúcar-polipéptido es 6, pueden unirse tres cadenas de azúcar maltosa, o pueden unirse dos cadenas de azúcar maltotriosa. Además, cuando el número total de residuos de azúcar presente en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido es 7, pueden unirse dos cadenas de azúcar maltosa y una cadena de azúcar maltotriosa, o una cadena de azúcar diGlcNAc que posee siete residuos de azúcar puede unirse. De manera similar, pueden unirse diversas combinaciones de cadenas de azúcar para casos en los que el número total de residuos de azúcar presentes en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido sea 8 o más.
- 10 **[0110]** El número de cadenas de azúcar unidas al complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención no está limitado, siempre que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido no pierda la característica de formar una estructura de lámina  $\beta$  por autoensamblaje en una solución acuosa que tiene un pH aproximadamente neutro. Por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6 cadenas, preferiblemente 1, 2 o 3 cadenas.
- 15 **[0111]** En el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención, la posición del residuo de aminoácido al que se une la cadena de azúcar no está limitada, siempre que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido no pierda la característica de formar un estructura de lámina  $\beta$  por autoensamblaje en una solución acuosa con un pH aproximadamente neutro. Por ejemplo, la posición del residuo de aminoácido al que se une la cadena de azúcar puede ser el lado N y/o C-terminal del polipéptido, o puede ser una posición diferente del lado N y C-terminal.
- 20 **[0112]** Preferiblemente, una cadena de azúcar se puede unir a cada aminoácido hasta la posición  $x$  contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N del polipéptido y cada aminoácido hasta la posición  $y$  contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal (donde  $x$  e  $y$  son números enteros,  $x \geq 0$ ,  $y \geq 0$ , y  $x + y$  es el número total de cadenas de azúcar unidas al polipéptido).
- 25 **[0113]** Más específicamente, cuando el número de cadenas de azúcar unidas al polipéptido es 1, dicha cadena de azúcar puede unirse al residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido o al residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal.
- 30 **[0114]** Además, cuando el número de cadenas de azúcar unidas al polipéptido es 2, dichas dos cadenas de azúcar pueden unirse a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en (1)-(3) a continuación:
- 35 (1) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal del polipéptido  
 (2) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal del polipéptido, y  
 (3) el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal del polipéptido y el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal de dicho polipéptido.
- 40 **[0115]** Además, cuando el número de cadenas de azúcar unidas al polipéptido es 3, dichas tres cadenas de azúcar pueden unirse a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en (1)-(4) a continuación:
- 45 (1) el primero, segundo y tercer residuo de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N del polipéptido  
 (2) el primero, segundo y tercer residuo de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal del polipéptido  
 (3) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal del polipéptido, y el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal del polipéptido, y  
 (4) el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal del polipéptido, y los residuos de aminoácido posicionados en las posiciones 1 y 2 contando desde el extremo C-terminal del polipéptido.
- 50 **[0116]** Se prefiere que la cadena de azúcar que se añada al complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención esté ramificada. Aquí, la cadena de azúcar unida al polipéptido es "una cadena de azúcar con una ramificación" como se usa en este documento no se limita a, por ejemplo, aquellos que poseen una ramificación en una cadena de azúcar tal como con una cadena de azúcar disialo, una cadena de azúcar asialo o una cadena de azúcar diGlcNAc, pero también abarcan, por ejemplo, los que tienen múltiples cadenas lineales de azúcar agregadas a un polipéptido para crear un estado en donde la cadena de azúcar se
- 55

ramifica en el péptido como un todo. Por ejemplo, los que tienen dos o más cadenas de azúcares lineales, tales como una cadena de azúcar de maltosa o una cadena de azúcar de maltotriosa unida a un péptido, también se incluyen en el presente documento como "una cadena de azúcar con una ramificación".

- 5 **[0117]** Un hidrogel como se usa en este documento significa un gel en donde el medio de dispersión es sustancialmente agua. El péptido de acuerdo con la presente invención formará un hidrogel cuando se dispersa en agua. La proporción de la mezcla entre el péptido y el agua no está particularmente limitada, y los expertos en la técnica pueden ajustar adecuadamente la proporción de la mezcla de acuerdo con la aplicación del hidrogel. Por ejemplo, cuando se fabrica un hidrogel con C(DiGlcNAc)-(RADA) 4 de acuerdo con una realización de la presente invención, se forma un hidrogel en un pH amplio cuando la concentración de péptido es de 0.5 %  
10 en peso o más, y se forma un hidrogel formado a un pH neutro, pero puede no formarse en un pH ácido cuando la concentración de péptido es aproximadamente 0.25 % en peso. De esta manera, el hidrogel fabricado a partir del péptido de acuerdo con la presente invención puede controlar la formación de hidrogel con el pH cuando la concentración de péptido es baja. Utilizando dicha naturaleza, puede eliminarse o descargarse rápidamente, por ejemplo, convirtiendo un gel en un sol cambiando el pH después de usar el hidrogel.
- 15 **[0118]** En la presente invención, el método para evaluar la resistencia o la naturaleza del hidrogel no está particularmente limitado, y por ejemplo puede evaluarse mediante un ensayo de carga de bolas de acero o una medición de la viscosidad cinética. En la prueba de carga de bolas de acero, por ejemplo, la resistencia del hidrogel puede evaluarse cargando una bola de acero de un peso determinado en la superficie de un hidrogel formado dentro de un tubo de Durham y observando si la bola de acero permanece en la superficie del hidrogel  
20 o se hunde. Además, en la prueba de carga de bolas de acero, la transparencia en el hidrogel o la presencia o ausencia de una materia insoluble o precipitación puede verificarse visualmente. En la medición de la viscosidad cinética del hidrogel, el cambio en la resistencia del hidrogel a lo largo del tiempo puede medirse midiendo la viscosidad cinética del hidrogel en cuestión con un reómetro.
- 25 **[0119]** Cuando se evalúa un hidrogel en los presentes Ejemplos, una operación de agitación vigorosa se engloba como una operación para formar un hidrogel. Se puede formar un gel altamente uniforme realizando una operación de agitación tan vigorosa, y se puede realizar una evaluación más confiable.
- 30 **[0120]** El hidrogel de acuerdo con la presente invención se puede emplear para diversas aplicaciones. Por ejemplo, dado que el hidrogel de acuerdo con la presente invención es altamente seguro para los organismos vivos, puede emplearse para aplicaciones médicas (un agente auxiliar de cirugía como una matriz hemostática o un material de embolización de vasos sanguíneos, un portador de liberación controlada tal como un agente farmacéutico, un apósito para heridas, por ejemplo, cirugía o medicina regenerativa, un material de protuberancia de mucosa, un material de reconstrucción del hueso alveolar, un material de reconstrucción de tejidos como un material de regeneración de la córnea y una matriz de cultivo tridimensional (por ejemplo, un experimento de cultivo de tejidos) o aplicaciones cosméticas (tales como productos de cuidado para la piel y cuidado del cabello). De manera particularmente preferible, puede emplearse como una matriz hemostática, un  
35 vehículo de liberación controlada o una matriz de cultivo.
- 40 **[0121]** Una matriz hemostática como se usa en este documento significa ampliamente una matriz empleada para detener el sangrado de un organismo vivo. La matriz hemostática de acuerdo con la presente invención no está limitada a aquellas que comprenden solo el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la presente invención y el agua, y puede comprender otros diversos componentes. Por ejemplo, al comprender un agente que tiene un componente desinfectante/esterilizador, no solo puede detener el sangrado de una herida, sino que al mismo tiempo esterilizar/desinfectar la herida.
- 45 **[0122]** Un portador de liberación controlada como se usa en este documento significa ampliamente un portador que tiene la naturaleza de liberar gradualmente la sustancia o agente encapsulado. La sustancia por encapsular en el portador de liberación controlada de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada, y pueden encapsularse diversas sustancias o agentes. Además, la sustancia o el agente por encapsular en el portador de liberación controlada de acuerdo con la presente invención no está limitado a un tipo, y pueden encapsularse dos o más tipos de sustancias o agentes simultáneamente.
- 50 **[0123]** Una matriz de cultivo como se usa en este documento significa ampliamente una matriz empleada para cultivo de células o tejidos. Por ejemplo, recubriendo una placa de cultivo celular con la matriz de cultivo de acuerdo con la presente invención y cultivando células, se puede mejorar el potencial de adherencia/crecimiento de las células. Además, por ejemplo, encapsulando células o tejidos en la matriz de cultivo de acuerdo con la presente invención y cultivando, se puede llevar a cabo un cultivo tridimensional eficiente de células o tejidos.
- 55 **[0124]** Un material de protuberancia mucosa como se usa en este documento significa ampliamente un material de inyección en submembrana para formar una protuberancia mucosa del sitio de la lesión en una cirugía de resección de la mucosa o una cirugía de desprendimiento submucoso para, por ejemplo, cáncer de estómago o esófago mediante cirugía endoscópica. Por ejemplo, al resecar el sitio de la lesión, por ejemplo, con un endoscopio, el material de protrusión tisular de acuerdo con la presente invención se inyecta debajo del sitio

de la lesión para permitir la protrusión del sitio de resección con el fin de facilitar la resección del sitio de la lesión.

5 **[0125]** Un material de embolización de vasos sanguíneos como se usa en este documento significa en términos amplios un material protésico que promueve la embolización intravascular para uso como un émbolo en la embolización arterial. En la embolización arterial, por ejemplo, para cáncer de hígado o fibroma uterino, cuando el material de embolización de vasos sanguíneos de acuerdo con la presente invención se inyecta en una arteria que está arriba del sitio de la lesión, se forma un hidrogel al contacto con la sangre. Esto puede bloquear la arteria que es la ruta de suministro de nutrientes a un tumor, matando así al tumor.

10 **[0126]** Un material de reconstrucción de tejido como se usa en este documento significa ampliamente un material que será el andamiaje en medicina regenerativa cuando se reconstruya un tejido *in vivo*. Por ejemplo, en el material de reconstrucción de tejidos según la presente invención se inyecta en la regeneración ósea, puede convertirse en el andamiaje para células que realicen osteogénesis, promoviendo así la regeneración ósea.

15 **[0127]** Además, el término "que comprende" como se usa en este documento, a menos que el contenido indique claramente que debe entenderse de otra manera, pretende la presencia de los elementos descritos (como componentes, pasos, elementos y números), y no excluye la presencia de otros elementos (como componentes, pasos, elementos y números).

20 **[0128]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados aquí (incluidos los términos técnicos y científicos) tienen los mismos significados que los ampliamente reconocidos por los expertos en la técnica de la tecnología a los que pertenece la presente invención. Los términos utilizados en este documento, a menos que se defina explícitamente lo contrario, deben interpretarse como que tienen significados consistentes con los significados en este documento y en los campos técnicos relacionados, y no deben interpretarse con significados idealizados o excesivamente formales.

25 **[0129]** Los términos tales como primero y segundo a veces se emplean para expresar diversos elementos, y debe reconocerse que estos elementos no deben estar limitados por estos términos. Estos términos se emplean únicamente con el fin de discriminar un elemento de otro, y es posible, por ejemplo, describir un primer elemento como segundo elemento y, de manera similar, describir un segundo elemento como primer elemento sin apartarse del alcance de la presente invención.

30 **[0130]** La presente invención se describirá ahora más específicamente mediante ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede realizarse mediante diversas realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones y no debe considerarse limitada a los ejemplos descritos en el presente documento.

35 **[0131]** Por ejemplo, Disialo-BrAc como se muestra aquí indica una cadena de azúcar disialo bromoacetilada. Además, por ejemplo, C(Disialo)-(RADA)<sub>4</sub> como se muestra en este documento indica que un residuo de cisteína que tiene una cadena de azúcar disialo unida al mismo está unido al extremo N-terminal de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos RADARADARADARADA.

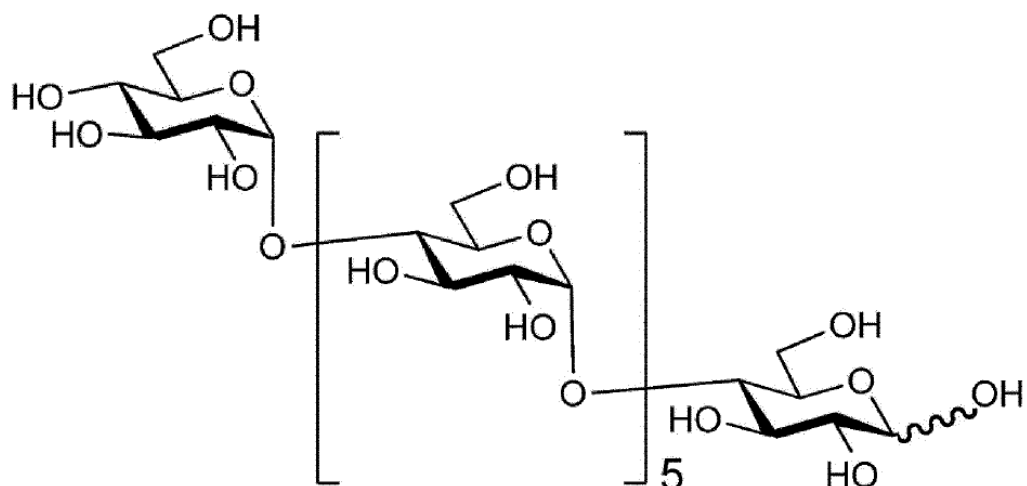
Ejemplos

(Ejemplo de síntesis 1) Síntesis de Maltoheptaosa-BrAc

(Ejemplo de síntesis 1-1) Aminación

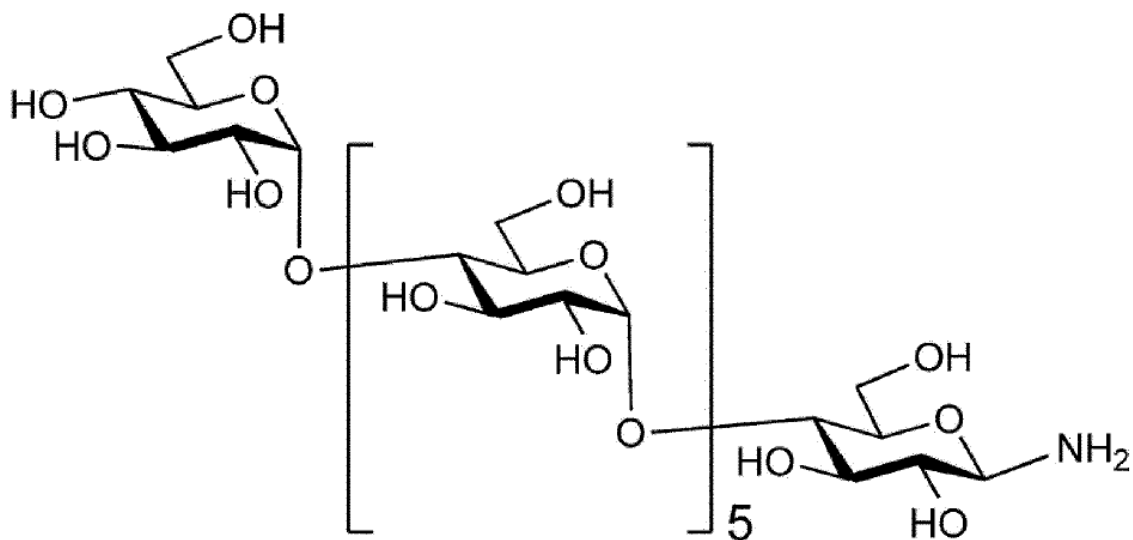
40 **[0132]** El Compuesto 1 representado por la siguiente Fórmula (11) (nombre del producto: maltoheptaosa, de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (53.2 mg, 46.1  $\mu$ mol) se disolvió en agua (5 mL). Se añadió hidrogenocarbonato de sodio (3.6 g) a la solución, se calentó a 37°C y luego se agitó durante 19 horas. Después de añadir el agua, se llevó a cabo concentración a presión reducida varias veces. Se disolvió de nuevo en agua y se liofilizó para obtener un liofilizado que comprende el compuesto 2 representado por la siguiente fórmula (12).

[Fórmula Química 12]



Fórmula (11)

[Fórmula Química 13]



Fórmula (12)

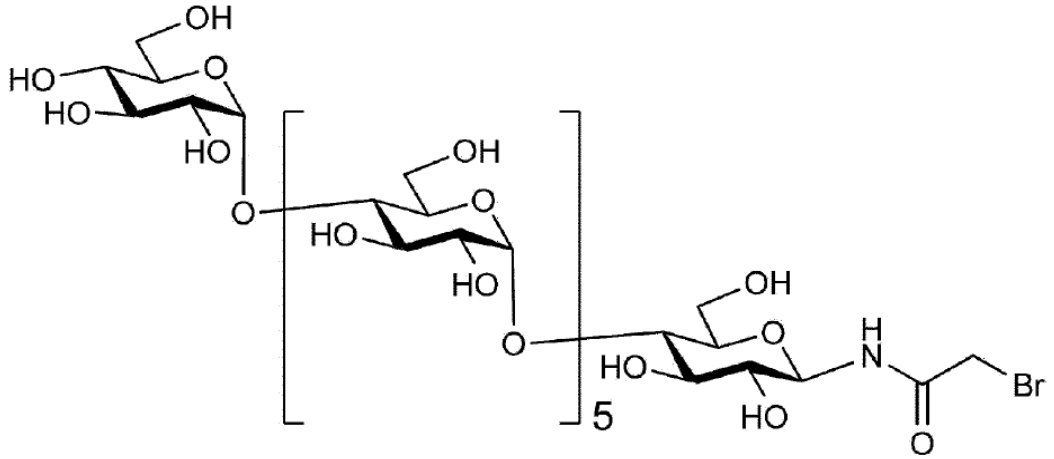
(Ejemplo de síntesis 1-2) Bromoacetilación

5 **[0133]** Se disolvieron en agua el compuesto 2 obtenido en el Ejemplo de síntesis 1-1 y carbonato de sodio (83.0 mg, 0.92 mmol, 20 equivalentes del compuesto 2) y se enfriaron a 0°C. Se añadió lentamente gota a gota bromuro de bromoacetilo disuelto en diclorometano (40.0 µl, 0.46 mmol, 10 equivalentes al compuesto 2) y se agitó durante 2 horas. Se sometió a partición con diclorometano y agua, y se añadió ácido bromhídrico a la fase acuosa. El agua se concentró parcialmente en condiciones de presión reducida.

10 **[0134]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, disolvente de desarrollo A: agua, B: acetonitrilo, gradiente A:B =

99.5:0.5 -> 90:10, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener Maltoheptaosa-BrAc representada por la siguiente fórmula (13) (26.7 mg, 20.9  $\mu$ mol, rendimiento 46 %).

[Fórmula Química 14]

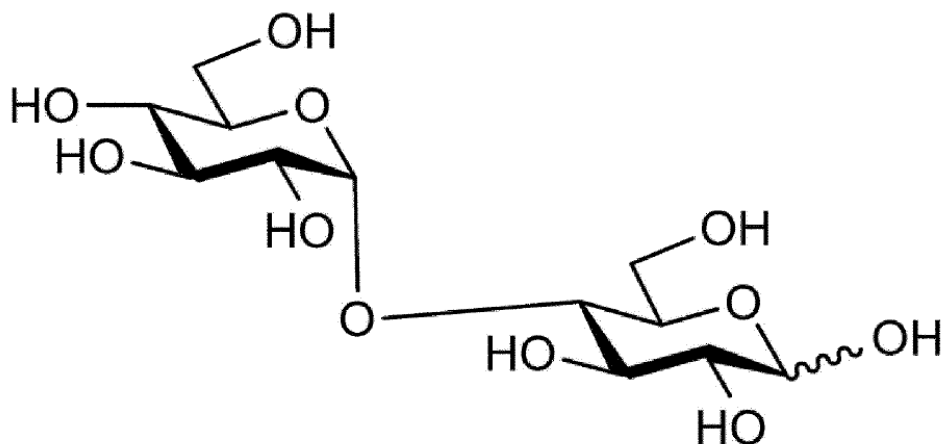


Fórmula (13)

(Ejemplo de síntesis 2) Síntesis de maltosa-BrAc

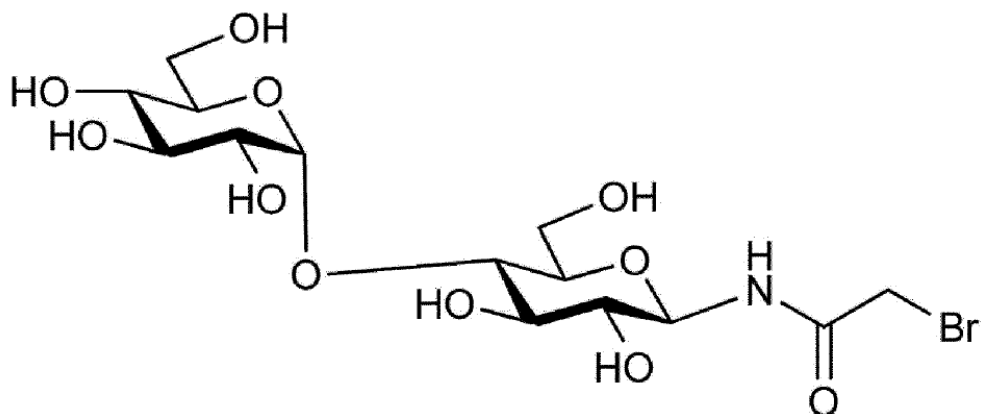
- 5 **[0135]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al del Ejemplo de síntesis 1, excepto que se empleó el compuesto 3 representado por la siguiente fórmula (14) (nombre del producto: maltosa, de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (200 mg, 0.58 mmol) en lugar del compuesto 1 para obtener Maltosa-BrAc representada por la siguiente fórmula (15) (179.1 mg, rendimiento 67 %).

[Fórmula Química 15]



Fórmula (14)

[Fórmula Química 16]



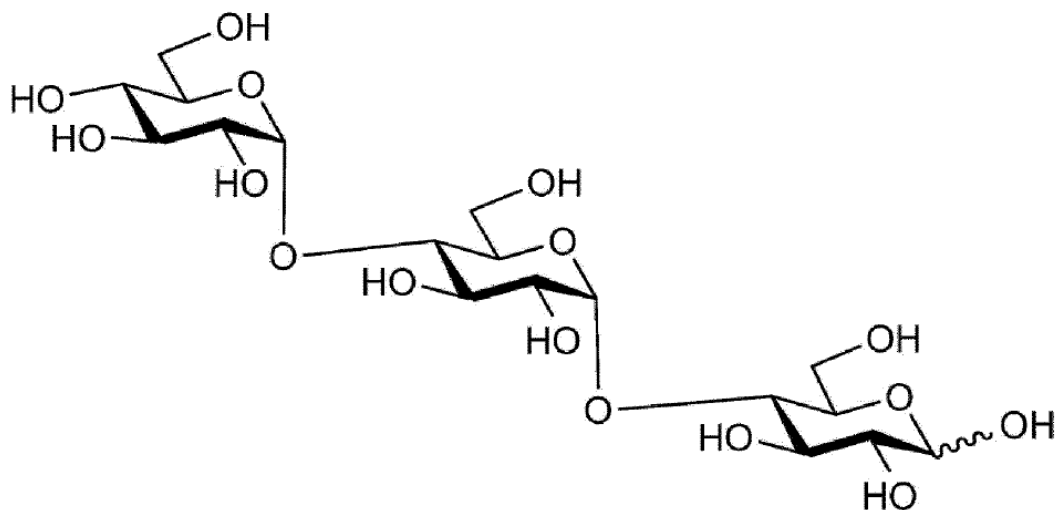
Fórmula (15)

(Ejemplo de Síntesis 3) Síntesis de Maltotriosa-BrAc

5 **[0136]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al del Ejemplo de síntesis 1, excepto que se empleó el compuesto 4 representado por la siguiente fórmula (16) (nombre del producto: maltotriosa, de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (100 mg, 198.6  $\mu$ mol) en lugar del compuesto 1 para obtener Maltotriosa-BrAc representado por la siguiente fórmula (17) (58.2 mg, rendimiento 47 %).

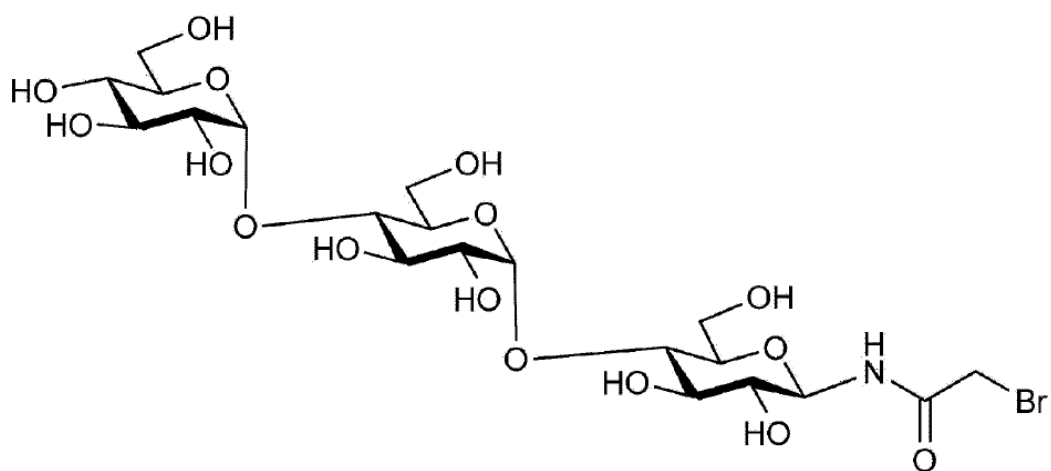


[Fórmula Química 17]



Fórmula (16)

[Fórmula Química 18]

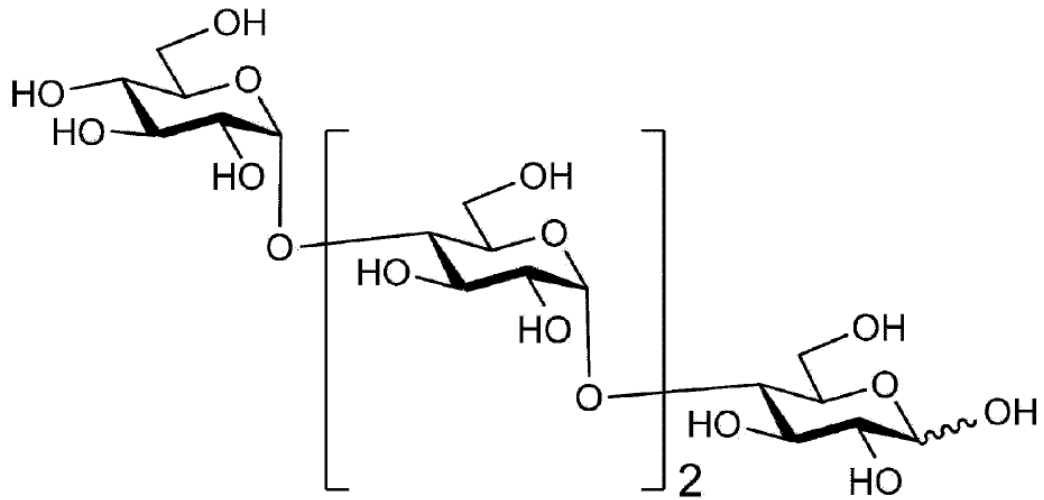


Fórmula (17)

(Ejemplo de síntesis 4) Síntesis de maltotetraosa-BrAc

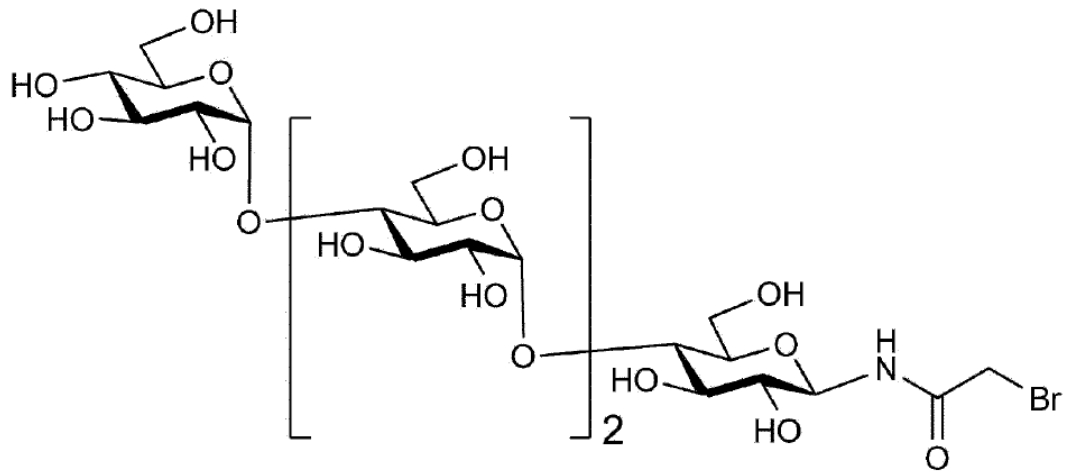
- 5 **[0137]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al del Ejemplo de síntesis 1, excepto que se empleó el compuesto 5 representado por la siguiente fórmula (18) (nombre del producto: maltotetraosa, de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (200 mg, 0.2 mmol) en lugar del compuesto 1 para obtener Maltotetraosa-BrAc representada por la siguiente Fórmula (19) (133.1 mg, rendimiento 51 %).

[Fórmula Química 19]



Fórmula (18)

[Fórmula Química 20]

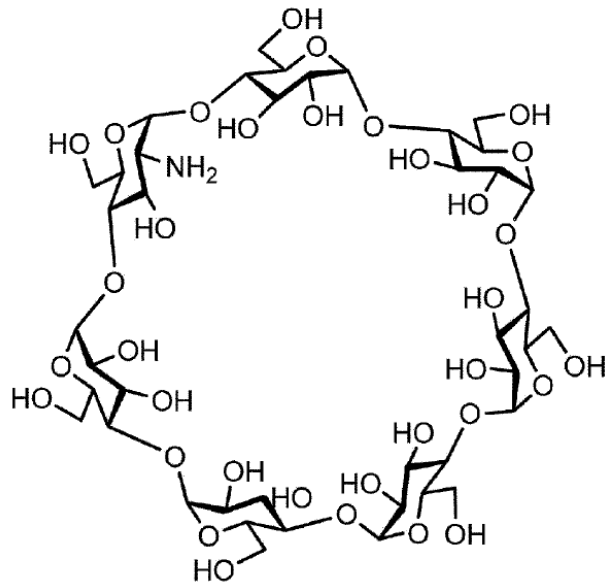


Fórmula (19)

(Ejemplo de síntesis 5) Síntesis de ( $\beta$ -ciclodextrina-BrAc)

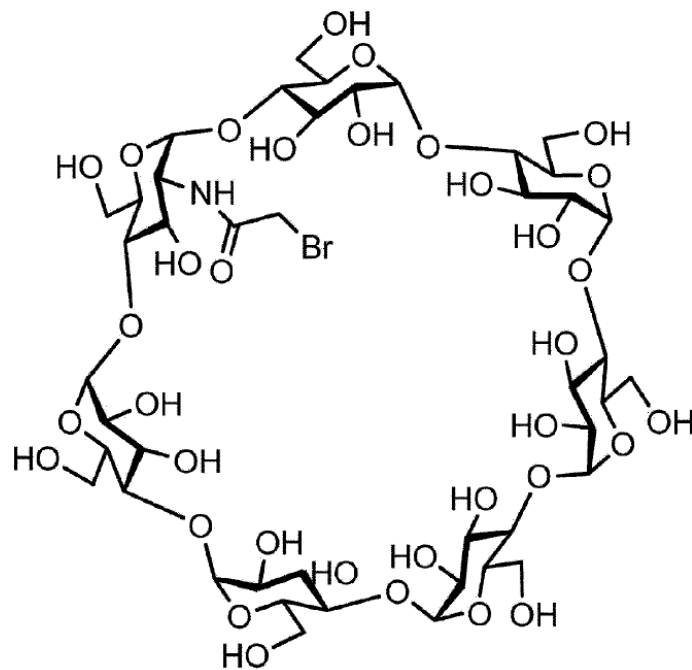
5 **[0138]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al del Ejemplo de síntesis 1-2, excepto que se empleó el compuesto 6 representado por la siguiente fórmula (20) (nombre del producto: 3A-amino-3A-desoxi-(2AS,3AS)- $\beta$ -ciclodextrinohidrato, de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (101.5 mg, 89.5  $\mu$ mol) en lugar del compuesto 1 para obtener  $\beta$ -ciclodextrina-BrAc representada por la siguiente fórmula (21) (31.2 mg, rendimiento 28 %).

[Fórmula Química 21]



Fórmula (20)

[Fórmula Química 22]



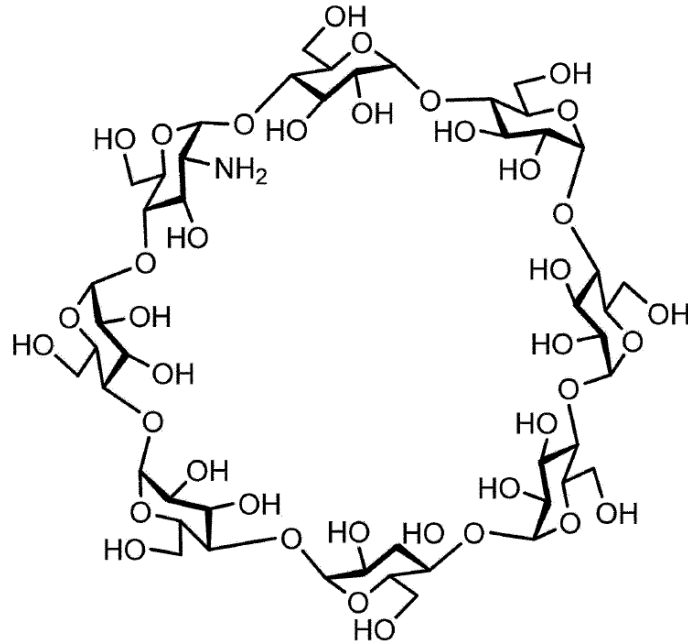
Fórmula (21)

(Ejemplo de síntesis 6) Síntesis de γ-ciclodextrina-BrAc

**[0139]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al del Ejemplo de síntesis 1-2, excepto que se utilizó el compuesto 7 representado por la siguiente fórmula (22) (nombre del producto: 3A-amino-3A-desoxi-(2AS,3AS)-γ-ciclodextrina hidrato, de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (100.0 mg, 77.1 μmol) en lugar del

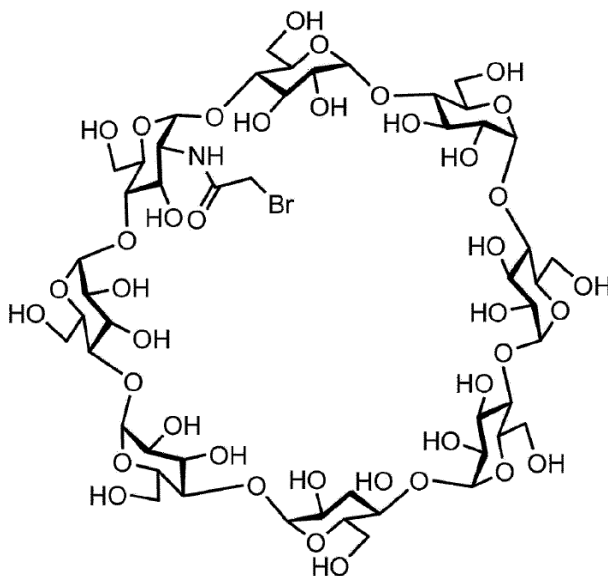
compuesto 1 para obtener  $\gamma$ -ciclodextrina-BrAc representada por la siguiente Fórmula (23) (41.1 mg, rendimiento 38 %).

[Fórmula Química 23]



Fórmula (22)

[Fórmula Química 24]

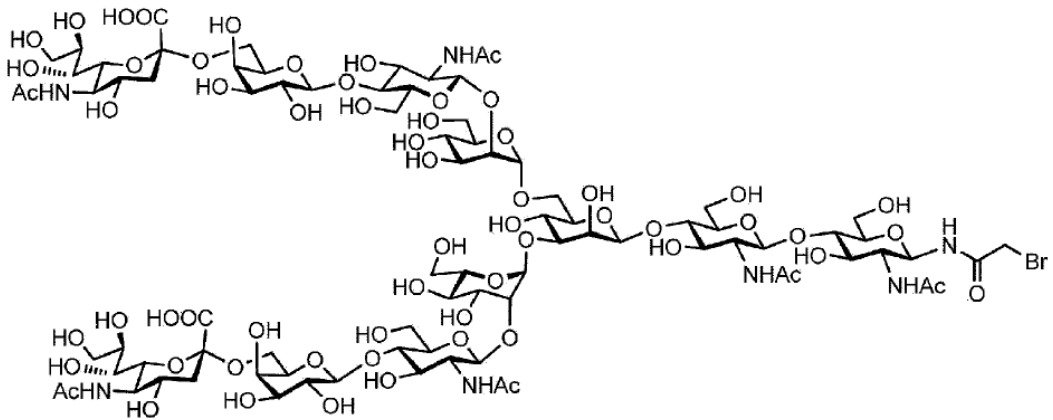


Fórmula (23)

5 (Ejemplo de síntesis 7) Síntesis de Disialo-BrAc

**[0140]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al descrito en el documento WO2005/010053 para obtener Disialo-BrAc representado por la siguiente fórmula (25).

[Fórmula Química 25]

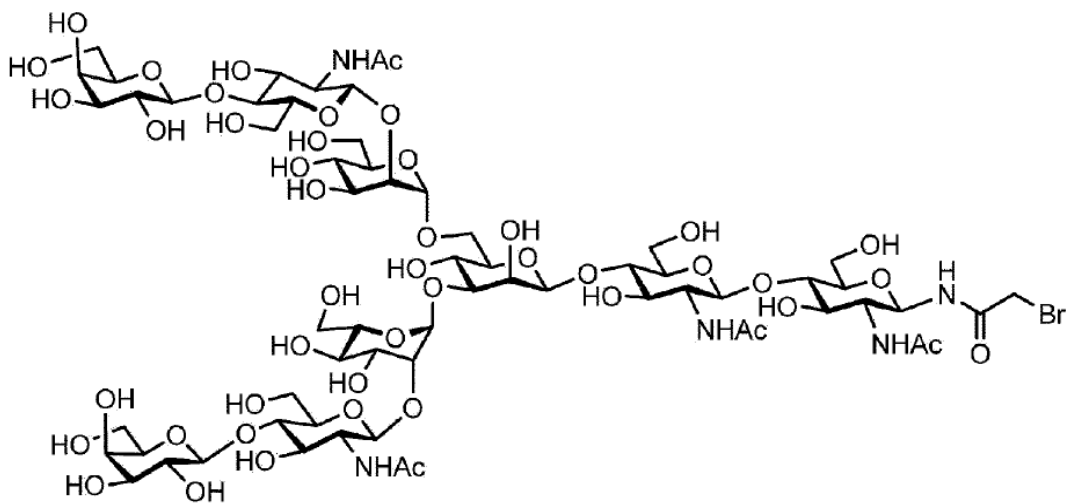


Fórmula (25)

(Ejemplo de síntesis 8) Síntesis de Asialo-BrAc

**[0141]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al descrito en el documento WO2005/010053 para obtener Asialo-BrAc representado por la siguiente fórmula (27).

[Fórmula Química 26]



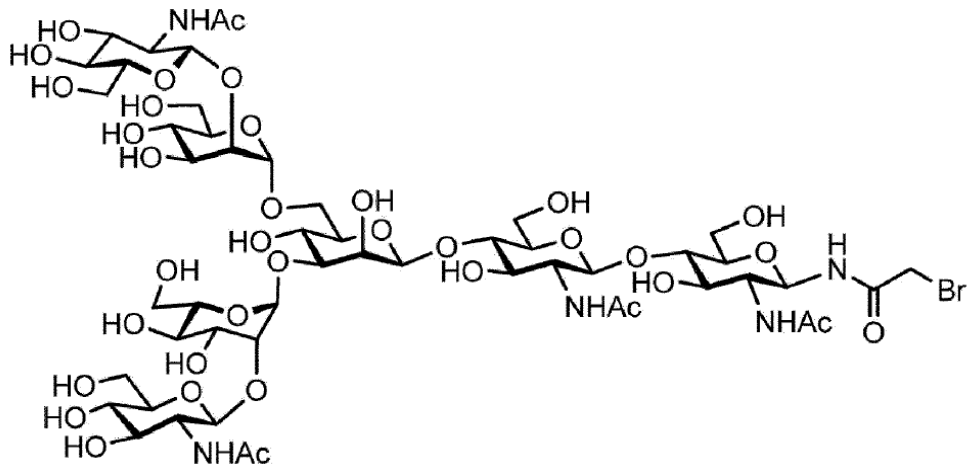
Fórmula (27)

5

(Ejemplo de síntesis 9) Síntesis de DiGlcNAc-BrAc

**[0142]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al descrito en el documento WO2005/010053 para obtener DiGlcNAc-BrAc representado por la siguiente Fórmula (29).

[Fórmula Química 27]

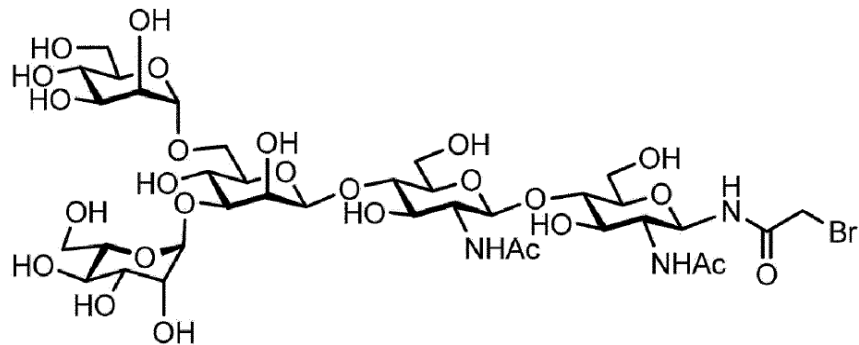


Fórmula (29)

(Ejemplo de síntesis 10) Síntesis de DiMan-BrAc

**[0143]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al descrito en el documento WO2005/010053 para obtener DiMan-BrAc representado por la siguiente fórmula (31).

[Fórmula Química 28]



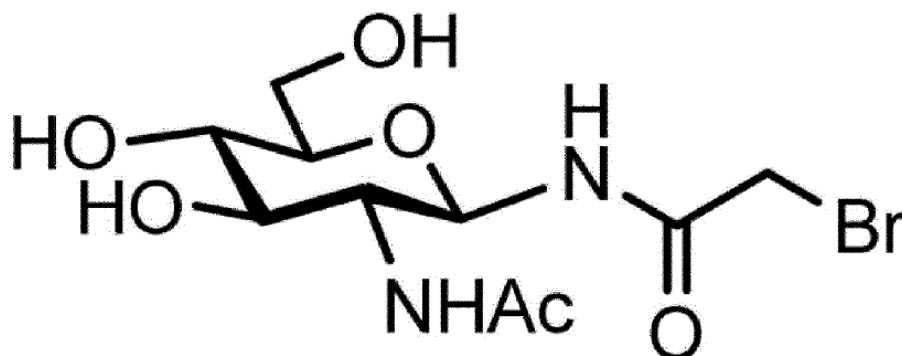
Fórmula (31)

5

(Ejemplo de síntesis 11) Síntesis de GlcNAc-BrAc

**[0144]** La síntesis se llevó a cabo con un método similar al descrito en el documento WO2005/010053 para obtener GlcNAc-BrAc representado por la siguiente fórmula (33).

[Fórmula Química 29]

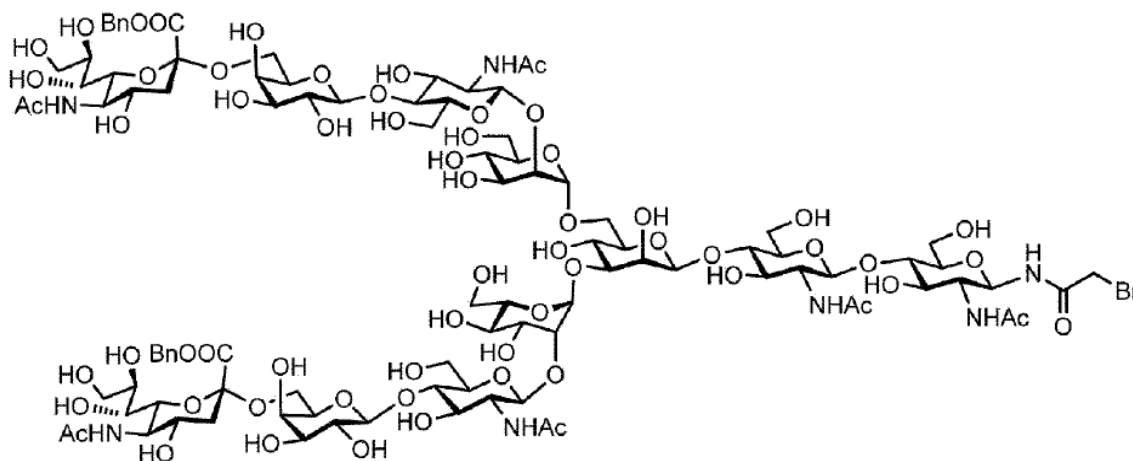


Fórmula (33)

(Ejemplo de síntesis 12) Síntesis de DiBn-Disialo-BrAc

- [0145]** Se añadieron secuencialmente a Disialo-BrAc (28.9 mg, 12.3  $\mu\text{mol}$ ), DMF (0.58 mL), bromuro de litio (21.5 mg, 248  $\mu\text{mol}$ ) y bromuro de bencilo (14.6  $\mu\text{l}$ , 122  $\mu\text{mol}$ ), y se hicieron reaccionar a 30°C durante 20 horas. Se añadió más bromuro de bencilo (14.6  $\mu\text{l}$ , 122  $\mu\text{mol}$ ) y se hizo reaccionar durante 20 horas. A la solución de reacción se le añadió tolueno (30 mL), se separó por centrifugación (10.000 x g, 10 minutos) y luego el precipitado se disolvió en agua (100  $\mu\text{L}$ ) y se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 8.0 mL/min, disolvente de desarrollo: agua:acetonitrilo = 95:5 -> 70:30, 20 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener DiBn-Disialo-BrAc representado por la siguiente fórmula (35) (7.6 mg, rendimiento 24 %).

[Fórmula Química 30]



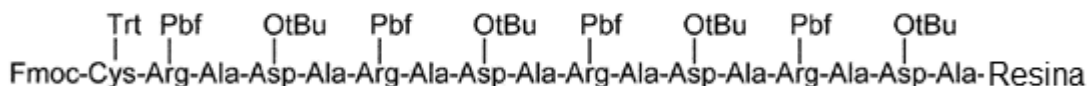
Fórmula (35)

MALDI-MS:(m/z) calculado para  $\text{C}_{100}\text{H}_{152}\text{BrN}_7\text{O}_{62}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  2544.8, encontrado: 2544.4.(Ejemplo de síntesis 13) Síntesis de C(Disialo)-(RADA)4(Ejemplo de síntesis 13-1) Síntesis de Ac-C(RADA)4-NH<sub>2</sub>

- [0146]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu\text{mol}$ ) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ), hexafluorofosfato de 3 óxidos de 1-bisdimetilaminometileno-5-cloro-1H-benzotriazolío (HCTU) (157.2 mg, 380  $\mu\text{mol}$ ), y diisopropiletilamina (DIPEA) (104.5  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (2.5 mL) y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina

al 20 % en DMF. Después del lavado con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente fórmula (36) (SEQ ID NO. 4) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

## [Fórmula Química 31]



## Fórmula (36)

5

**[0147]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitó durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió ácido trifluoroacético (TFA):agua:triisopropilsilano:etanoditiol (=90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 -> 78:22 %, 11 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (37) (SEQ ID NO. 5) (32.7 mg).

10

15 [Fórmula química 32]

**[0148]**

Fórmula (37)

(Ejemplo de síntesis 13-2) Reacción de glicosilación de tiol

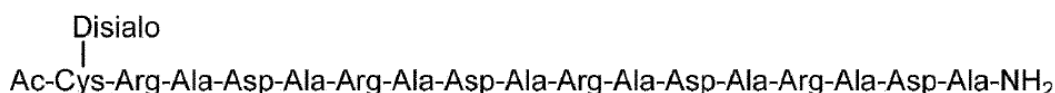
20

**[0149]** El polipéptido obtenido con el método descrito en el Ejemplo de síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (20.5 mg, 11.2 µmol) y Disialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 7 (66.0 mg, 28.0 µmol, 2,5 equivalentes el péptido 1) se disolvió en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.7 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas.

25

**[0150]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0,1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (38) (SEQ ID NO. 6) (23.8 mg, 5.83 µmol, rendimiento 52 %).

## [Fórmula Química 33]



## Fórmula (38)

30

**[0151]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>121</sub>H<sub>203</sub>N<sub>35</sub>O<sub>62</sub>S: [M+2H]<sup>2+</sup> 2040.5, [M+3H]<sup>3+</sup> 1360.7, [M+4H]<sup>4+</sup> 1020.7, encontrado: 2040.4, 1360.6, 1020.7.

(Ejemplo de síntesis 14) Síntesis de C(Asialo)-(RADA)<sub>4</sub>

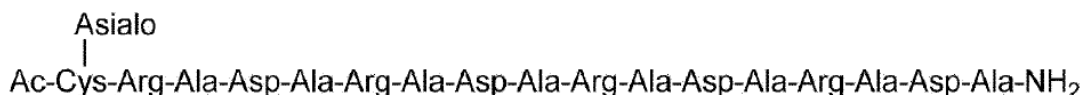
35

**[0152]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (22,7 mg, 12,5 µmol) y Asialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 8 (55.0 mg, 31.2 µmol, 2,5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 4.7 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y reaccionó a temperatura ambiente durante 3 horas.



- 5 **[0153]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 18 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente Fórmula (39) (SEQ ID NO. 7) (20.5 mg, 5.86 µmol, rendimiento 47 %).

## [Fórmula Química 34]



Fórmula (39)

**[0154]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{133}H_{223}N_{35}O_{72}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1749.2,  $[M+3H]^{3+}$  1166.5,  $[M+4H]^{4+}$  875.1, encontrado: 1749.3, 1166.2, 874.9.

(Ejemplo de síntesis 15) Síntesis de C(DiGlcNAc)-(RADA) 4

- 10 **[0155]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (25.3 mg, 13.9 µmol) y DiGlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 9 (30.0 mg, 20.9 µmol, 1.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 4.7 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y reaccionó a temperatura ambiente durante 3 horas.

- 15 **[0156]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 -> 81:19, 10 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (40) (SEQ ID NO. 8) (23.9 mg, 7.53 µmol, rendimiento 54 %).

## [Fórmula Química 35]



Fórmula (40)

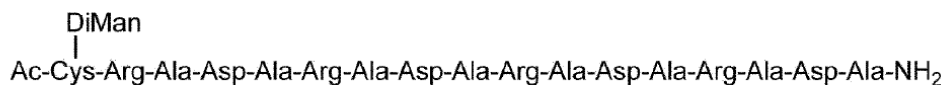
- 20 **[0157]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{121}H_{203}N_{35}O_{62}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1587.1,  $[M+3H]^{3+}$  1058.4,  $[M+4H]^{4+}$  794.0, encontrado: 1586.7, 1058.1, 793.8.

(Ejemplo de síntesis 16) Síntesis de C(DiMan)-(RADA)4

- 25 **[0158]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (15.2 mg, 8.37 µmol) y DiMan-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 10 (21.5 mg, 20.9 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.2, 3.1 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

- 30 **[0159]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0,09 % de TFA/10 % de agua/ 90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (41) (SEQ ID NO. 9) (16.9 mg, 6.11 µmol, rendimiento 73 %).

## [Fórmula Química 36]



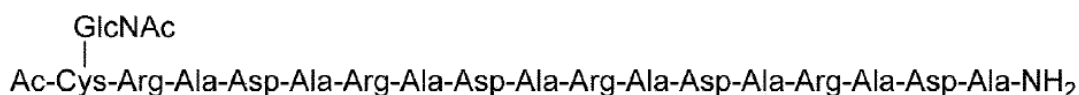
Fórmula (41)

**[0160]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{121}H_{203}N_{35}O_{62}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1383.9,  $[M+3H]^{3+}$  922.9,  $[M+4H]^{4+}$  629.5, encontrado: 1383.6, 922.7, 692.3.

(Ejemplo de síntesis 17) Síntesis de C(GlcNAc)-(RADA)<sub>4</sub>

- 5 **[0161]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (14.9 mg, 8.21  $\mu$ mol) y GlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 11 (5.6 mg, 16.4  $\mu$ mol, 2.0 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.1 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y reaccionó a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 10 **[0162]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 5:95, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (42) (SEQ ID NO. 10) (15.4 mg, 7.42  $\mu$ mol, rendimiento del 90 %).

## [Fórmula Química 37]



Fórmula (42)

- 15 **[0163]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{79}H_{134}N_{32}O_{32}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1039.1,  $[M+3H]^{3+}$  693.1,  $[M+4H]^{4+}$  520.0, encontrado: 1039.0, 692.6, 520.0.

(Ejemplo de síntesis 18) Síntesis de C(Maltoheptaosa)-(RADA)<sub>4</sub>

- 20 **[0164]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (9.3 mg, 5.12  $\mu$ mol) y Maltoheptaosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 1 (9.8 mg, 7.68  $\mu$ mol, 1.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.1 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas.
- 25 **[0165]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 -> 72:28, 16 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (43) (SEQ ID NO. 11) (5.1 mg, 1.70  $\mu$ mol, rendimiento 33 %).

## [Fórmula Química 38]



Fórmula (43)

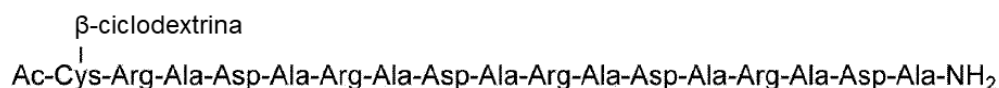
**[0166]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{113}H_{191}N_{31}O_{62}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1505.0,  $[M+3H]^{3+}$  1003.7, encontrado: 1504.6, 1003.4.

(Ejemplo de síntesis 19) Síntesis de C( $\beta$ -ciclodextrina)-(RADA)4

5 **[0167]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 13-1 (SEQ ID NO 5) (17.7 mg, 9.75  $\mu$ mol) y  $\beta$ -ciclodextrina-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 5 (36.7 mg, 29.2  $\mu$ mol, 3.0 equivalentes al péptido 1) se disolvieron en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.3 ml) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas.

10 **[0168]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 -> 72:28, 16 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (44) (SEQ ID NO. 12) (6.8 mg, 2.27  $\mu$ mol, rendimiento 23 %).

## [Fórmula Química 39]



## Fórmula (44)

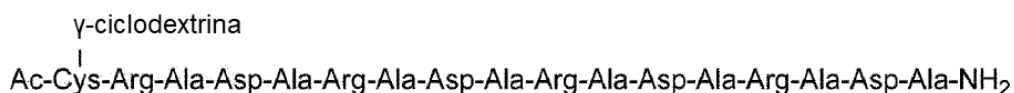
**[0169]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{113}H_{189}N_{31}O_{61}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1496.0,  $[M+3H]^{3+}$  997.7,  $[M+4H]^{4+}$  748.5, encontrado: 1495.6, 997.7, 748.3.

(Ejemplo de síntesis 19) Síntesis de C( $\beta$ -ciclodextrina)-(RADA)4

15 **[0170]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 13-1 (SEQ ID NO. 5) (16.0 mg, 8.81  $\mu$ mol) y  $\gamma$ -ciclodextrina-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 6 ((36.7 mg, 25.9  $\mu$ mol, 3.0 equivalentes al péptido 1) se disolvieron en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.0 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas.

20 **[0171]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 5:95, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (45) (SEQ ID NO. 13) (6.0 mg, 1.90  $\mu$ mol, rendimiento 22 %).

## [Fórmula Química 40]



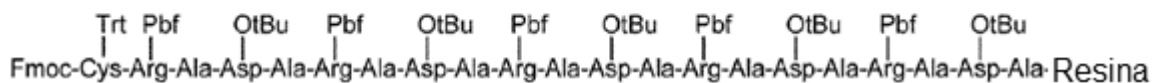
25 **[0172]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{119}H_{199}N_{31}O_{66}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1577.1,  $[M+3H]^{3+}$  1051.7,  $[M+4H]^{4+}$  789.0, encontrado: 1576.7, 1051.4, 788.8.

(Ejemplo de síntesis 21) Síntesis de C(Disialo)-(RADA)5(Ejemplo de síntesis 21-1) Síntesis de Ac-C(RADA)5-NH<sub>2</sub>

30 **[0173]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu$ mol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400  $\mu$ mol), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu$ mol) y DIPEA (104.5  $\mu$ l, 600  $\mu$ mol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente fórmula (46) (SEQ ID NO. 14) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

35

## [Fórmula Química 41]



## Fórmula (46)

5 [0174] El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA: agua:triisopropilsilano:etanoditiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 - > 78:22 %, 11 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener el polipéptido compuesto representado por la siguiente fórmula (47) (SEQ ID NO. 15) (32.7 mg).

[Fórmula química 42]

## [0175]

Ac-Cys-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH<sub>2</sub> Fórmula (47)

15 (Ejemplo de síntesis 21-2) Reacción de glicosilación de tior

[0176] El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 21-1 (SEQ ID NO. 15) (13.9 mg, 6.24 µmol) y Disialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 7 (36.5 mg, 15.6 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.1 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

20 [0177] La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (48) (SEQ ID NO. 16) (7.8 mg, 1.74 µmol, rendimiento 28 %).

## [Fórmula Química 43]



## Fórmula (48)

25

[0178] ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>171</sub>H<sub>284</sub>N<sub>44</sub>O<sub>94</sub>S: [M+3H]<sup>3+</sup> 1498.5, [M+4H]<sup>4+</sup> 1124.1, [M+5H]<sup>5+</sup> 899.5, encontrado: 1498.6, 1123.9, 899.4.

(Ejemplo de síntesis 22) Síntesis de C(Asialo)-(RADA)5

30 [0179] El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 21-1 (SEQ ID NO. 15) (18.8 mg, 8.43 µmol) y Asialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 8 (44.5 mg, 25.3 µmol, 3.0 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.2, 2.8 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

35 [0180] La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (49) (SEQ ID NO. 17) (16.0 mg, 4.09 µmol, rendimiento 49 %).

## [Fórmula Química 44]



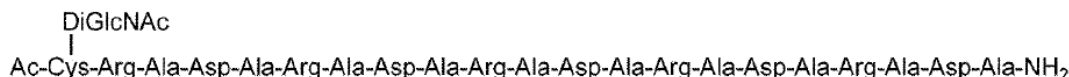
## Fórmula (49)

**[0181]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{149}H_{250}N_{42}O_{78}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1955.9,  $[M+3H]^{3+}$  1304.3,  $[M+4H]^{4+}$  978.5, encontrado: 1955.8, 1304.2, 978.2.

(Ejemplo de síntesis 23) Síntesis de C(DiGlcNAc)-(RADA)5

- 5 **[0182]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 21-1 (SEQ ID NO. 15) (19.4 mg, 8.70  $\mu\text{mol}$ ) y DiGlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 9 (20.0 mg, 21.7  $\mu\text{mol}$ , 2,5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.2, 3.1 mL) que comprendía 33  $\mu\text{M}$  de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 10 **[0183]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 60:40, 20 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (50) (SEQ ID NO. 18) (16.8 mg, 4.69  $\mu\text{mol}$ , rendimiento 54 %).

## [Fórmula Química 45]



## Fórmula (50)

- 15 **[0184]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{149}H_{250}N_{42}O_{78}S$ :  $[M+3H]^{3+}$  1196.2,  $[M+4H]^{4+}$  897.4, encontrado: 1195.9, 897.2.

(Ejemplo de síntesis 24) Síntesis de C(GlcNAc)-(RADA)5

- 20 **[0185]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 21-1 (SEQ ID NO. 15) (18.8 mg, 8.43  $\mu\text{mol}$ ) y GlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 11 (8.7 mg, 25.3  $\mu\text{mol}$ , 3.0 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en guanidina 7 M, regulador fosfato 0.2 M (pH 7.2, 4.2 mL) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 25 **[0186]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 5:95, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (51) (SEQ ID NO. 19) (14.9 mg, 5.99  $\mu\text{mol}$ , rendimiento del 71 %).

## [Fórmula Química 46]



## Fórmula (51)

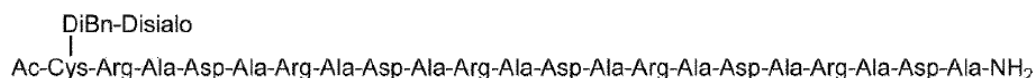
**[0187]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{95}H_{161}N_{39}O_{38}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1245.8,  $[M+3H]^{3+}$  830.9,  $[M+4H]^{4+}$  623.4, encontrado: 1245.1, 830.8, 623.3.

(Ejemplo de síntesis 25) Síntesis de C(DiBn-Disialo)-(RADA)5

5 **[0188]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 21-1 (SEQ ID NO. 15) (20.7 mg, 9.29  $\mu\text{mol}$ ) y DiBn-Disialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 12 (58.6 mg, 23.2  $\mu\text{mol}$ , 2.5 equivalentes al péptido 1) se disolvieron en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.2 mL) que comprendía 33  $\mu\text{M}$  de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora.

10 **[0189]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 85:15  $\rightarrow$  73:27, 17 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (52) (SEQ ID NO. 20) (7.5 mg, 1.61  $\mu\text{mol}$ , rendimiento del 17 %).

## [Fórmula Química 47]



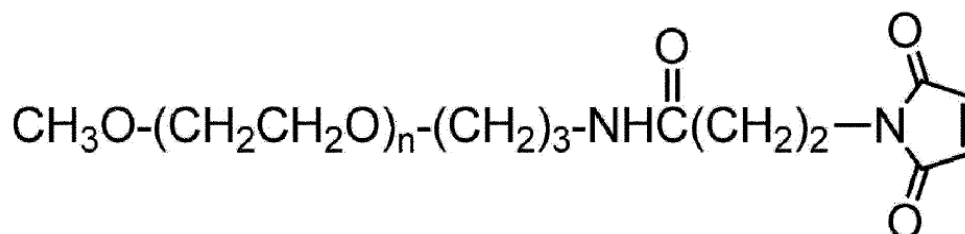
Fórmula (52)

**[0190]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $\text{C}_{185}\text{H}_{296}\text{N}_{44}\text{O}_{94}\text{S}$ :  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  1558.6,  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$  1169.2,  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$  935.5, encontrado: 1558.4, 1169.0, 925.6.

(Ejemplo de síntesis 26) Síntesis de C(PEG2000)-(RADA)5

15 **[0191]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 21-1 (SEQ ID NO. 15) (15.9 mg, 7.13  $\mu\text{mol}$ ) y un compuesto representado por la siguiente Fórmula (53) (PEG maleimidado, nombre del producto: SUNBRIGHT™ ME-020MA, peso molecular promedio 2333, de NOF Corporation) (24.9 mg, 10.7  $\mu\text{mol}$ , 1.5 equivalentes al péptido 1) eran regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.4 mL) que comprendía guanidina 8 M, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora.

## [Fórmula Química 48]



Fórmula (53)

20 **[0192]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 75:25  $\rightarrow$  40:60, 12 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (54) (SEQ ID NO. 21) (10.9 mg, 2.39  $\mu\text{mol}$ , rendimiento 34 %).

25

## [Fórmula Química 49]

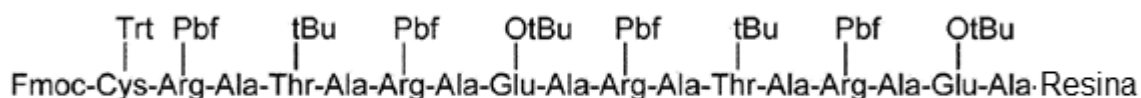


Fórmula (54)

(Ejemplo de síntesis 27) Síntesis de C(Asialo)-(RATARAEA)2

(Ejemplo de síntesis 27-1) Síntesis de Ac-C-(RATARAEA)2-NH<sub>2</sub>

5 **[0193]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu$ mol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400  $\mu$ mol), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu$ mol) y DIPEA (104.5  $\mu$ l, 600  $\mu$ mol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente Fórmula (55) (SEQ ID NO. 22) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

**[Fórmula Química 50]****Fórmula (55)**

10

**[0194]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano:etanoditiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 - > 78:22 %, 11 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente Fórmula (56) (SEQ ID NO. 23) (32.7 mg).

15

[Fórmula química 51]

20

**[0195]**

Fórmula (56)

(Ejemplo de síntesis 27-2) Reacción de glicosilación de tior

25 **[0196]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 27-1 (SEQ ID NO. 23) (7.3 mg, 4.02  $\mu$ mol) y Asialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 8 (17.7 mg, 16.5  $\mu$ mol, 1.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 1.3 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

30 **[0197]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 29:71, 11 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (57) (SEQ ID NO. 24) (4.6 mg, 1.32  $\mu$ mol, rendimiento 33 %).

**[Fórmula Química 52]****Fórmula (57)**

35 **[0198]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>123</sub>H<sub>211</sub>N<sub>35</sub>O<sub>60</sub>S: [M+3H]<sup>3+</sup> 1166.5, [M+4H]<sup>4+</sup> 875.1, encontrado: 1166.2, 875.1.

(Ejemplo de síntesis 28) Síntesis de C(DiGlcNAc)-(RATARAEA)2

**[0199]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 27-1 (SEQ ID NO. 23) (20.0 mg, 11.0 µmol) y Disialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 7 (23.7 mg, 16.5 µmol, 1.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en DMSO (0.9 mL). Se añadió DIPEA (5.8 µl) a la solución y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- 5 **[0200]** A la solución de reacción se le añadió agua destilada (4.0 mL) y se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7,0 mL/min., revelando solvente A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 29:71, 11 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (58) (SEQ ID NO. 25) (23.9 mg, 7.53 µmol, rendimiento 68 %).

[Fórmula Química 53]



Fórmula (58)

10

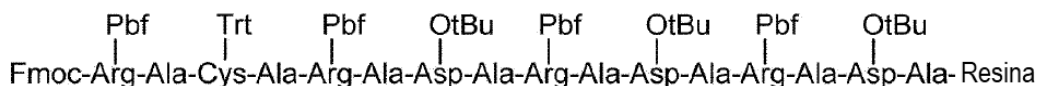
**[0201]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>123</sub>H<sub>211</sub>N<sub>35</sub>O<sub>60</sub>S: [M+3H]<sup>3+</sup> 1058.4, [M+4H]<sup>4+</sup> 794.0, encontrado: 1057.8, 793.9.

(Ejemplo de síntesis 29) Síntesis de RAC(Asialo)-A-(RADA)3

(Ejemplo de síntesis 29-1) Síntesis de Ac-RACA-(RADA)3-NH<sub>2</sub>

- 15 **[0202]** La resina PEGA de amida de Rink (100 µmol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400 µmol), HCTU (157.2 mg, 380 µmol) y DIPEA (104.5 µl, 600 µmol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente Fórmula (59) (SEQ ID NO. 26) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.
- 20

[Fórmula Química 54]



Formula (59)

- 25 **[0203]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano:etanoditiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 - > 78:22 %, 11 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (60) (SEQ ID NO. 27) (32.7 mg).
- 30

[Fórmula química 55]

**[0204]**

- 35 Ac-Arg-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH<sub>2</sub> Fórmula (60)

(Ejemplo de síntesis 29-2) Reacción de glicosilación de tiol

**[0205]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 29-1 (SEQ ID NO. 27) (14.1 mg, 8.29 µmol) y Asialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 8 (36.0 mg, 20.7 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos



en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.6 mL) que comprendía 33  $\mu\text{M}$  de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora.

- 5 **[0206]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 29:71, 11 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (61) (SEQ ID NO. 28) (13.4 mg, 3.96  $\mu\text{mol}$ , rendimiento 48 %).

[Fórmula Química 56]



Fórmula (61)

- 10 **[0207]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $\text{C}_{129}\text{H}_{218}\text{N}_{34}\text{O}_{69}\text{S}$ :  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  1691.7,  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  1128.1, encontrado: 1691.8, 1128.2.

(Ejemplo de síntesis 30) Síntesis de RAC(DiGlcNAc)-A-(RADA)3

- 15 **[0208]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 29-1 (SEQ ID NO. 27) (10.1 mg, 5.94  $\mu\text{mol}$ ) y Disialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 7 (21.3 mg, 14.8  $\mu\text{mol}$ , 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.0 mL) que comprendía 33  $\mu\text{M}$  de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas.

- 20 **[0209]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7,0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (62) (SEQ ID NO. 29) (11.9 mg, 3.89  $\mu\text{mol}$ , rendimiento 66 %).

[Fórmula Química 57]



Fórmula (62)

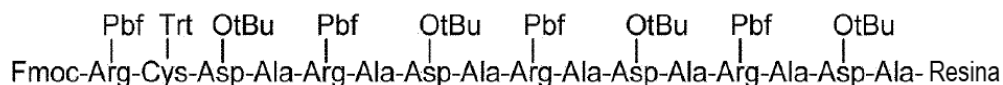
**[0210]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $\text{C}_{117}\text{H}_{198}\text{N}_{34}\text{O}_{59}\text{S}$ :  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  1529.5,  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  1020.0,  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$  765.3, encontrado: 1529.2, 1019.8, 765.1.

(Ejemplo de síntesis 31) Síntesis de RC(Asialo)-DA-(RADA) 3

- 25 (Ejemplo de síntesis 31-1) Síntesis de Ac-RCDA-(RADA)3-NH<sub>2</sub>

- 30 **[0211]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu\text{mol}$ ) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu\text{mol}$ ) y DIPEA (104.5  $\mu\text{l}$ , 600  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente fórmula (63) (SEQ ID NO. 30) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

## [Fórmula Química 58]



Fórmula (63)

5 **[0212]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano:etanodiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 -> 78:22 %, 11 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (64) (SEQ ID NO. 31) (32.7 mg).

10

[Fórmula química 59]

**[0213]**

Fórmula (64)

(Ejemplo de síntesis 31-2) Reacción de glicosilación de tiol

15 **[0214]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 31-1 (SEQ ID NO. 31) (14.8 mg, 8.48 µmol) y Asialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 8 (37.4 mg, 21.2 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.8 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

20

**[0215]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 29:71, 11 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (65) (SEQ ID NO. 32) (21.7 mg, 6.34 µmol, rendimiento del 75 %).

## [Fórmula Química 60]



Fórmula (65)

25

**[0216]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>130</sub>H<sub>218</sub>N<sub>34</sub>O<sub>71</sub>S: [M+2H]<sup>2+</sup> 1713.7, [M+3H]<sup>3+</sup> 1142.8, [M+4H]<sup>4+</sup> 857.3, encontrado: 1713.7, 1142.5, 857.1.

(Ejemplo de síntesis 32) Síntesis de RC(DiGlcNAc)-DA-(RADA)<sub>3</sub>

30 **[0217]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 31-1 (SEQ ID NO. 31) (11.0 mg, 6.30 µmol) y DiGlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 9 (22.6 mg, 15.7 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.1 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

35

**[0218]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución del gradiente

de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (66) (SEQ ID NO. 33) (19.0 mg, 6.12 µmol, rendimiento 97 %).

## [Fórmula Química 61]



## Fórmula (66)

5 **[0219]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>118</sub>H<sub>198</sub>N<sub>34</sub>O<sub>61</sub>S: [M+2H]<sup>2+</sup> 1551.6, [M+3H]<sup>3+</sup> 1034.7, [M+4H]<sup>4+</sup> 776.3, encontrado: 1551.2, 1034.5, 776.1.

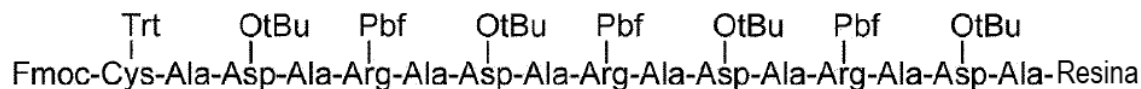
(Ejemplo de síntesis 33) Síntesis de C(Asialo)-ADA-(RADA)<sub>3</sub>

(Ejemplo de síntesis 33-1) Síntesis de Ac-CADA-(RADA)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>

10 **[0220]** La resina PEGA de amida de Rink (100 µmol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400 µmol), HCTU (157.2 mg, 380 µmol) y DIPEA (104.5 µl, 600 µmol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente Fórmula (67) (SEQ ID NO. 34) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

15

## [Fórmula Química 62]



## Fórmula (67)

20 **[0221]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano:etanoditiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 88:12 - > 78:22 %, 11 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (68) (SEQ ID NO. 35) (32.7 mg).

25

[Fórmula química 63]

**[0222]**

Fórmula (68)

(Ejemplo de síntesis 33-2) Reacción de glicosilación de tiol

30 **[0223]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 33-1 (SEQ ID NO. 35) (13.0 mg, 7.83 µmol) y Asialo-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 8 (34.5 mg, 19.6 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.6 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

35 **[0224]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 95:5 -> 29:71, 11 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (69) (SEQ ID NO. 36) (15.2 mg, 4.55 µmol, rendimiento 58 %).

## [Fórmula Química 64]



## Fórmula (69)

**[0225]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{127}H_{211}N_{31}O_{71}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1671.1,  $[M+3H]^{3+}$  1114.4,  $[M+4H]^{4+}$  836.1, encontrado: 1671.2, 1114.1, 835.8.

(Ejemplo de síntesis 34) Síntesis de C(DiGlcNAc)-ADA-(RADA)3

- 5 **[0226]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de síntesis 33-1 (9.9 mg, 5.96  $\mu\text{mol}$ ) y DiGlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de síntesis 9 (21.4 mg, 15.7  $\mu\text{mol}$ , 2.5 equivalentes al péptido 1) se disolvió en regulador de fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.1 mL) que comprendía 33  $\mu\text{M}$  de TCEP y 8 M de clorhidrato de guanidina, y reaccionó a temperatura ambiente durante 4 horas.
- 10 **[0227]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10  $\rightarrow$  75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (70) (SEQ ID NO. 37) (10.9 mg, 3.61  $\mu\text{mol}$ , rendimiento 61 %).

## [Fórmula Química 65]



## Fórmula (70)

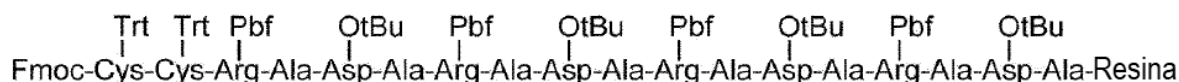
- 15 **[0228]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{115}H_{191}N_{31}O_{61}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1509.0,  $[M+3H]^{3+}$  1006.3,  $[M+4H]^{4+}$  755.0, encontrado: 1508.7, 1006.1, 754.9.

(Ejemplo de síntesis 35) Síntesis de 2C(maltosa)-(RADA)4

(Ejemplo de síntesis 35-1) Síntesis de Ac-2C-(RADA)4-NH<sub>2</sub>

- 20 **[0229]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu\text{mol}$ ) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu\text{mol}$ ) y DIPEA (104.5  $\mu\text{l}$ , 600  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente fórmula (71) (SEQ ID NO. 38) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.
- 25

## [Fórmula Química 66]



## Fórmula (71)

El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piperidina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar

5 con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano:etanoditiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 - > 75:25 %, 11 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (72) (SEQ ID NO. 39).

[Fórmula química 67]

**[0231]**

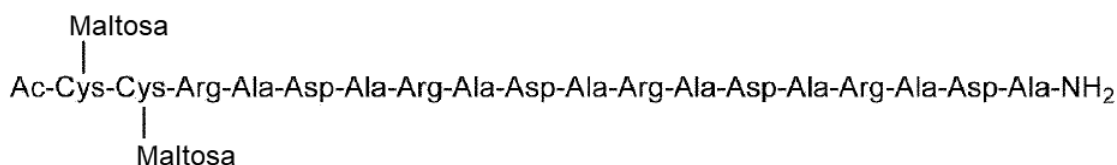
10 Ac-Cys-Cys-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH<sub>2</sub> Fórmula (72)

(35-2) Reacción de glicosilación del tiol.

15 **[0232]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 35-1 (SEQ ID NO. 39) (9.8 mg, 5.11 µmol) y Maltosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 2 (11.8 mg, 54.6 µmol, 5.0 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 1.7 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 horas.

20 **[0233]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de polipéptido de azúcar representado por la siguiente fórmula (73) (SEQ ID NO. 40) (9.2 mg, 3.43 µmol, rendimiento 67 %).

[Fórmula Química 68]



Fórmula (73)

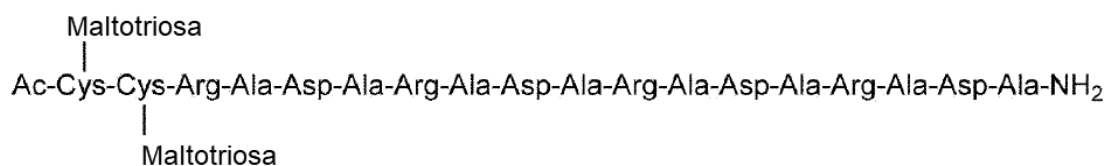
**[0234]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>100</sub>H<sub>169</sub>N<sub>33</sub>O<sub>49</sub>S<sub>2</sub>: [M+2H]<sup>2+</sup> 1341.9, [M+3H]<sup>3+</sup> 894.9, [M+4H]<sup>4+</sup> 671.4, encontrado: 1341.6, 894.7, 671.3.

(Ejemplo de síntesis 36) Síntesis de 2C(maltotriosa)-(RADA)<sub>4</sub>

25 **[0235]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 35-1 (SEQ ID NO. 39) (17.5 mg, 9.12 µmol) y Maltotriosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 3 (34.1 mg, 54.6 µmol, 6.0 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 3.1 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 horas.

30 **[0236]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (74) (SEQ ID NO. 41) (19.6 mg, 3.61 µmol, rendimiento 72 %).

[Fórmula Química 69]



Fórmula (74)

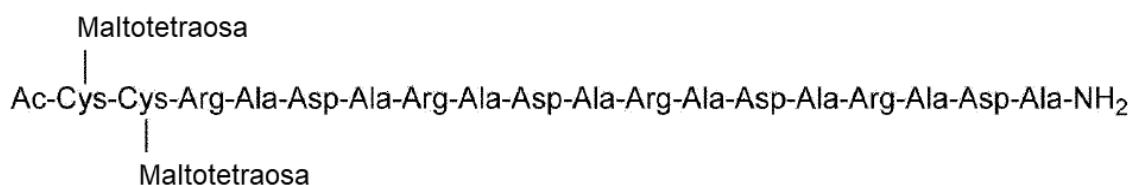
**[0237]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{112}H_{189}N_{33}O_{59}S_2$ :  $[M+2H]^{2+}$  1504.0,  $[M+3H]^{3+}$  1003.0,  $[M+4H]^{4+}$  752.5, encontrado: 1503.7, 1002.7, 752.3.

(Ejemplo de síntesis 37) Síntesis de 2C(Maltotetraosa)-(RADA)4

5 **[0238]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 35-1 (SEQ ID NO. 39) (9.8 mg, 5.11  $\mu$ mol) y Maltotetraosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 4 (20.1 mg, 25.5  $\mu$ mol, 5.0 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 1.7 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

10 **[0239]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente Fórmula (75) (SEQ ID NO. 42) (10.6 mg, 3.18  $\mu$ mol, rendimiento 62 %).

[Fórmula Química 70]



Fórmula (75)

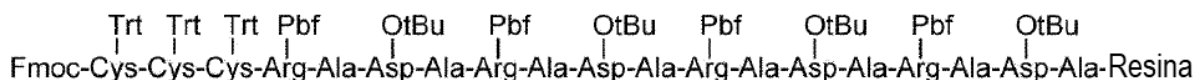
15 **[0240]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{124}H_{209}N_{33}O_{69}S_2$ :  $[M+2H]^{2+}$  1666.2,  $[M+3H]^{3+}$  1111.1,  $[M+4H]^{4+}$  833.6, encontrado: 1666.2, 1110.8, 833.3.

(Ejemplo de síntesis 38) Síntesis de 3C(maltosa)-(RADA)4

(Ejemplo de síntesis 38-1) Síntesis de Ac-3C-(RADA)4-NH<sub>2</sub>

20 **[0241]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu$ mol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400  $\mu$ mol), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu$ mol) y DIPEA (104.5  $\mu$ l, 600  $\mu$ mol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente fórmula (76) (SEQ ID NO. 43) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo  
25 en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

[Fórmula Química 71]



Fórmula (76)

30 **[0242]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua triisopropilsilano:etanoditol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75: 25 %, 11 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (77) (SEQ ID NO. 44).  
35

[Fórmula química 72]

**[0243]**

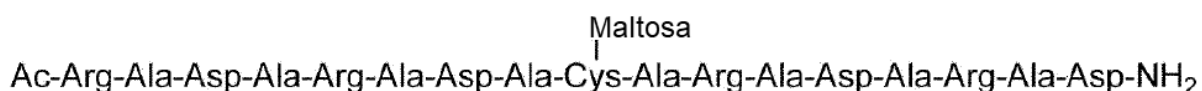
Ac-Cys-Cys-Cys-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH<sub>2</sub> Fórmula (77)



**[0250]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 39-1 (SEQ ID NO. 47) (15.4 mg, 8.48  $\mu$ mol) y la Maltosa-BrAc sintetizada en el Ejemplo de Síntesis 2 (9.8 mg, 21.2  $\mu$ mol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.9 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

- 5 **[0251]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (81) (SEQ ID NO. 48) (17.8 mg, 8.10  $\mu$ mol, rendimiento 96 %).

[Fórmula Química 76]



Fórmula (81)

10

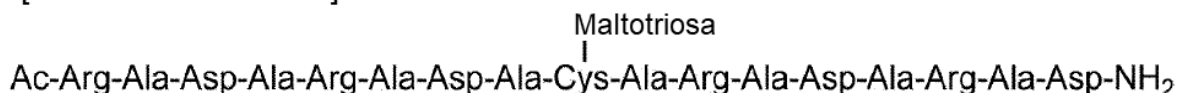
**[0252]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{83}H_{141}N_{31}O_{37}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1099.6,  $[M+3H]^{3+}$  733.4,  $[M+4H]^{4+}$  550.3, encontrado: 1099.5, 733.0, 550.2.

(Ejemplo de Síntesis 40) Síntesis de (RADA)2-C(Maltotriosa)-(ARAD)2

- 15 **[0253]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 39-1 (SEQ ID NO. 47) (14.8 mg, 8.15  $\mu$ mol) y Maltotriosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 3 (12.7 mg, 20.3  $\mu$ mol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.8 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

- 20 **[0254]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m), 20 x 250 mm, rata de flujo: 7,0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (82) (SEQ ID NO. 49) (13.8 mg, 5.85  $\mu$ mol, rendimiento 72 %).

[Fórmula Química 77]



Fórmula (82)

- 25 **[0255]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{89}H_{151}N_{31}O_{42}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1180.2,  $[M+3H]^{3+}$  787.1,  $[M+4H]^{4+}$  590.6, encontrado: 1180.5, 787.0, 590.8.

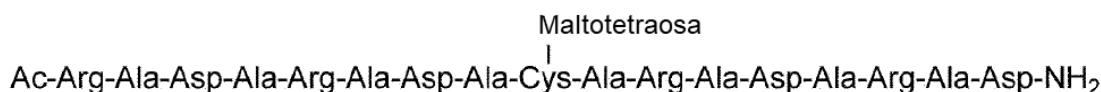
(Ejemplo de síntesis 41) Síntesis de (RADA)2-C(Maltotetraosa)-(ARAD)2

- 30 **[0256]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 39-1 (SEQ ID NO. 47) (14.0 mg, 7.71  $\mu$ mol) y Maltotetraosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 4 (15.2 mg, 20.3  $\mu$ mol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.6 mL) que comprendía 33  $\mu$ M de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2.5 horas.

- 35 **[0257]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución del gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (83) (SEQ ID NO. 50) (14.9 mg, 5.91  $\mu$ mol, rendimiento 77 %).



## [Fórmula Química 78]



Fórmula (83)

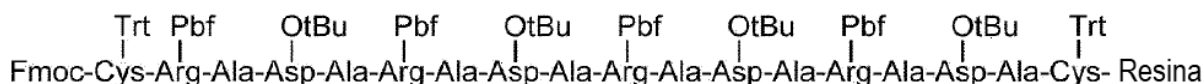
**[0258]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{95}H_{161}N_{31}O_{47}S$ :  $[M+2H]^{2+}$  1261.8,  $[M+3H]^{3+}$  841.5,  $[M+4H]^{4+}$  631.4, encontrado: 1261.6, 841.4, 631.3.

(Ejemplo de síntesis 42) Síntesis de C(maltosa)-(RADA)4-C(maltosa)

5 (Ejemplo de síntesis 42-1) Síntesis de Ac-C-(RADA)4-C-NH<sub>2</sub>

**[0259]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu$ mol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Cys(Trt)-OH (124.5 mg, 400  $\mu$ mol), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu$ mol) y 2,4,6-trimetilpiridina (79.3  $\mu$ l, 600  $\mu$ mol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 1 hora. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente fórmula (84) (SEQ ID NO. 51) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

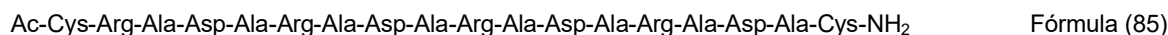
## [Fórmula Química 79]



Fórmula (84)

15 **[0260]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano:etanodiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 - > 75: 25 %, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (85) (SEQ ID NO. 52).

[Fórmula química 80]

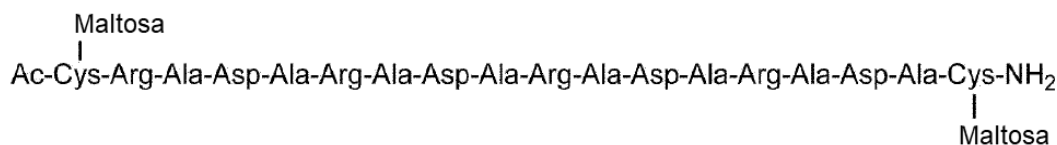
25 **[0261]**

(Ejemplo de síntesis 42-2) Reacción de glicosilación de tiol

30 **[0262]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 42-1 (SEQ ID NO. 52) (14.7 mg, 7.66  $\mu$ mol) y Maltosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 2 (17.7 mg, 38.3  $\mu$ mol, 5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en 33  $\mu$ M de TCEP y una sal de hidrocloreuro que comprendía 8 M de clorhidrato de guanidina, regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.6 mL) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

35 **[0263]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (86) (SEQ ID NO. 53) (6.5 mg, 2.42  $\mu$ mol, rendimiento 32 %).

## [Fórmula Química 81]



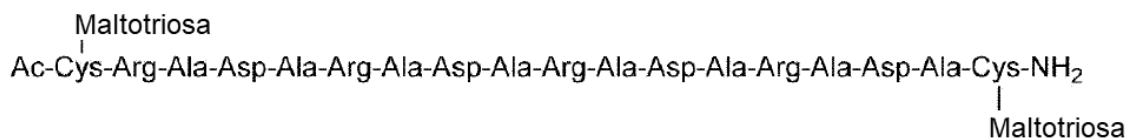
Fórmula (86)

**[0264]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{100}H_{169}N_{33}O_{49}S_2$ :  $[M+2H]^{2+}$  1341.9,  $[M+3H]^{3+}$  894.9,  $[M+4H]^{4+}$  671.4, encontrado: 1341.5, 894.7, 671.3.

(Ejemplo de síntesis 43) Síntesis de C(maltotriosa)-(RADA)4-C(maltotriosa)

- 5 **[0265]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 42-1 (SEQ ID NO. 52) (13.9 mg, 7.24  $\mu\text{mol}$ ) y Maltotriosa-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 3 (22.6 mg, 36.2  $\mu\text{mol}$ , 5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en 33  $\mu\text{M}$  de TCEP y una sal de hidrocioruro que comprendía 8 M de clorhidrato de guanidina, regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.5 mL) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 10 **[0266]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu\text{m}$ ),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (87) (SEQ ID NO. 54) (9.6 mg, 3.19  $\mu\text{mol}$ , rendimiento 44 %).

## [Fórmula Química 82]



Fórmula (87)

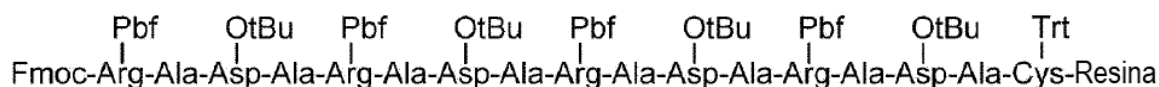
- 15 **[0267]** ESI-MS: (m/z) calculado para  $C_{112}H_{189}N_{33}O_{59}S_2$ :  $[M+2H]^{2+}$  1504.1,  $[M+3H]^{3+}$  1003.0,  $[M+4H]^{4+}$  752.5, encontrado: 1503.8, 1002.8, 752.4.

(Ejemplo de síntesis 44) Síntesis de Ac-(RADA)4-C(DiGlcNAc)

(Ejemplo de síntesis 44-1) Síntesis de Ac-(RADA)4-C-NH<sub>2</sub>

- 20 **[0268]** La resina PEGA de amida de Rink (100  $\mu\text{mol}$ ) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Cys(Trt)-OH (124.5 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ), HCTU (157.2 mg, 380  $\mu\text{mol}$ ) y 2,4,6-trimetilpiridina (79.3  $\mu\text{l}$ , 600  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 1 hora. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente
- 25 fórmula (88) (SEQ ID NO. 55) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

## [Fórmula Química 83]



Fórmula (88)

- 30 **[0269]** El grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadieron anhídrido acético y piridina y se agitaron durante 1 hora. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:trioisopropilsilano:etanoditiol (= 90:2.5:5:2.5), y se agitó

- durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 - > 75:25 %, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un polipéptido representado por la siguiente fórmula (89) (SEQ ID NO. 56).

[Fórmula química 84]

**[0270]**

Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>                      Fórmula (89)

- 10 (Ejemplo de síntesis 44-2) Reacción de glicosilación de tiol

**[0271]** El polipéptido sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 44-1 (SEQ ID NO.56) (15.1 mg, 8.31 µmol) y DiGlcNAc-BrAc sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 9 (29.8 mg, 20.8 µmol, 2.5 equivalentes al péptido 1) fueron disueltos en regulador fosfato 0.2 M (pH 7.3, 2.8 mL) que comprendía 33 µM de TCEP y clorhidrato de guanidina 8 M, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

- 15 **[0272]** La solución de reacción se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 µm), φ 20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25, 15 minutos de elución con gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (90) (SEQ ID NO. 57) (15.8 mg, 5.01 µmol, rendimiento 60 %).

[Fórmula Química 85]

DiGlcNAc  
|  
Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>

Fórmula (90)

- 20 **[0273]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>121</sub>H<sub>203</sub>N<sub>35</sub>O<sub>62</sub>S: [M+2H]<sup>2+</sup> 1587.1, [M+3H]<sup>3+</sup> 1058.4, [M+4H]<sup>4+</sup> 794.0, encontrado: 1586.7, 1058.1, 793.8.

(Ejemplo de síntesis 45) Síntesis de Ac-N(Asialo) (RADA) 4

(Ejemplo de Síntesis 45-1) Síntesis de Fmoc-(RADA)4-Resina

- 25 **[0274]** La resina PEGA de amida de Rink (100 µmol) se recogió en una columna para la síntesis en fase sólida, se lavó con DMF y diclorometano, seguido de la adición de una solución de Fmoc-Ala-OH (124.5 mg, 400 µmol), HCTU (157.2 mg, 380 µmol) y DIPEA (104.5 µl, 600 µmol) en DMF (2.5 mL), y se agitó durante 15 minutos. Después de lavar con diclorometano y DMF, se eliminó el grupo protector Fmoc por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF, se sintetizó un polipéptido unido a resina protegido con el método de síntesis en fase sólida peptídica mediante el método Fmoc representado por la siguiente Fórmula (91) (SEQ ID NO. 58) con un sintetizador de péptidos Prelude™. La reacción de condensación se llevó a cabo en DMF utilizando HCTU como agente de condensación.

[Fórmula Química 86]

Pbf      OtBu      Pbf      OtBu      Pbf      OtBu      Pbf      OtBu  
|        |        |        |        |        |        |  
Fmoc-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Resina

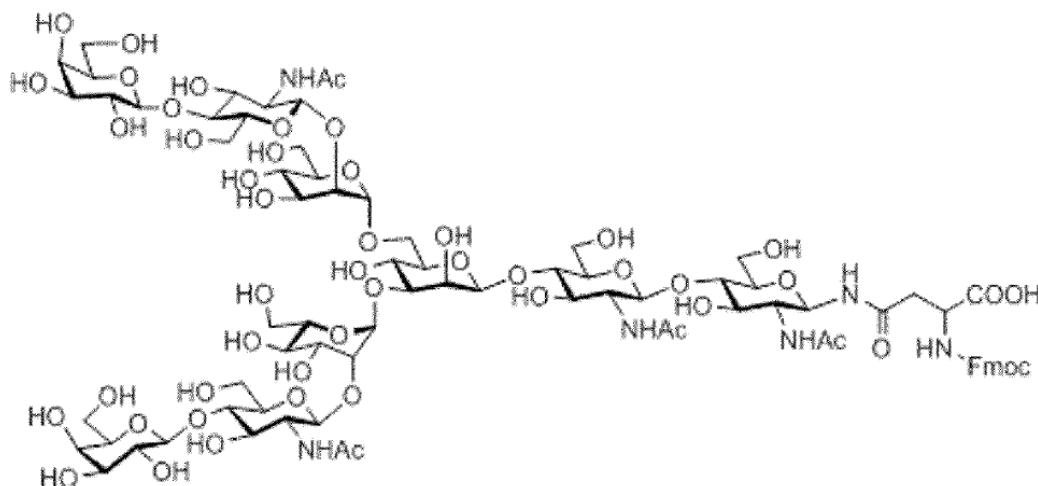
Fórmula (91)

(Ejemplo de síntesis 45-2) Reacción de condensación de la cadena de azúcar sobre la resina

- 35 **[0275]** El grupo protector Fmoc del polipéptido unido a resina (10 µmol) sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 45-1 se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, Fmoc-Asn(Asialo)-OH representado por la siguiente fórmula (92) (29.8 mg, 15 µmol), DMF-DMSO (1/1, v/v, 433 µL). Se añadieron secuencialmente tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (6.4 mg, 30 µmol) y DIPEA (5.2 µL, 30 µmol) durante la noche. Después de lavar con

DMF y diclorometano, el grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, una solución de ácido acético (2.86  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (6.8 mg, 50  $\mu$ mol) y se añadió N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (7.3  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol) en DMF (500  $\mu$ L) y se agitó durante 1 hora.

[Fórmula Química 87]



Fórmula (92)

5 Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano (= 95:2.5:2.5), y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75: 25 %, 15 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (93) (SEQ ID NO. 59) (5.5 mg).

[Fórmula Química 88]



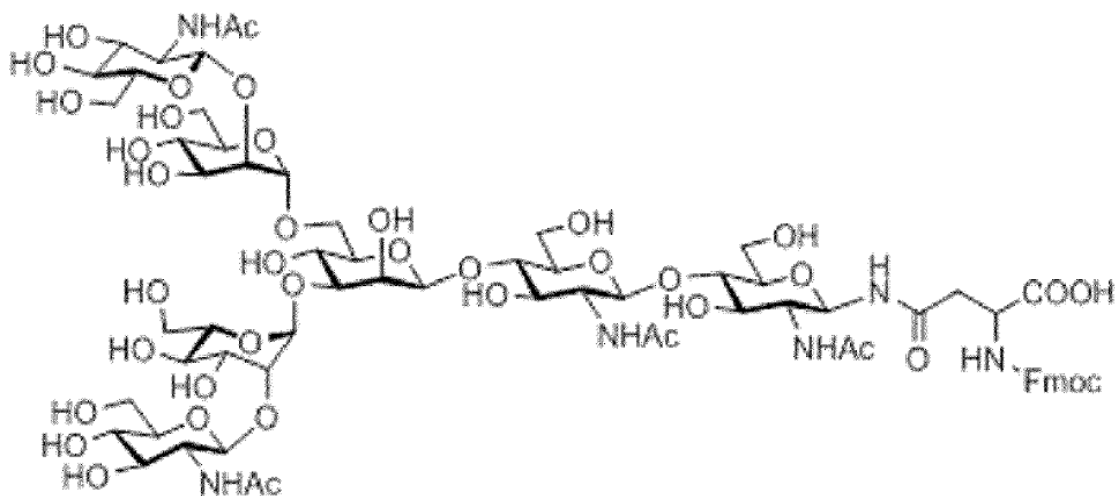
Fórmula (93)

15 **[0277]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>132</sub>H<sub>221</sub>N<sub>35</sub>O<sub>72</sub>: [M+2H]<sup>2+</sup> 1726.2, [M+3H]<sup>3+</sup> 1151.1, [M+4H]<sup>4+</sup> 863.6, encontrado: 1726.0, 1150.8, 863.4.

#### Ejemplo de síntesis 46 Síntesis de Ac-N(DiGlcNAc) (RADA)4

20 **[0278]** El grupo protector Fmoc del polipéptido unido a resina (32.1  $\mu$ mol) sintetizado en el Ejemplo de Síntesis 45-1 se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, Fmoc-Asn(DiGlcNAc)-OH representado por la siguiente fórmula (94) (79.5 mg, 15  $\mu$ mol), DMSO-DMF (1/1, v/v, 2.5 mL), TBTU (20.6 mg, 96.3  $\mu$ mol) y DIPEA (17.2  $\mu$ L, 96.3  $\mu$ mol) se agregaron secuencialmente y se agitaron durante 2 horas. Después de lavar con DMF y diclorometano, el grupo protector Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF. Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió una solución de ácido acético (9.2  $\mu$ L, 160.5  $\mu$ mol), HOBt (21.6 mg, 160.5  $\mu$ mol) y DIC (25.1  $\mu$ L, 160.5  $\mu$ mol) en DMF (2 mL) y se agitó durante 1 hora.

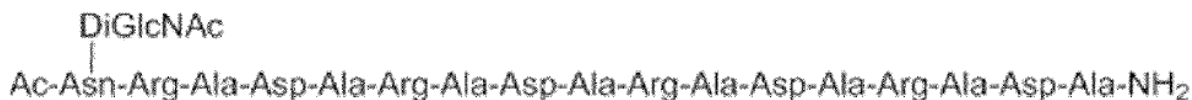
## [Fórmula Química 89]



Fórmula (94)

- 5 **[0279]** Después de lavar con DMF y diclorometano, se añadió TFA:agua:triisopropilsilano (= 95:2.5:2.5) y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración, se añadió dietil éter enfriado al filtrado y se obtuvo un péptido crudo como precipitado. Una porción del péptido crudo se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5  $\mu$ m),  $\phi$  20 x 250 mm, rata de flujo: 7.0 mL/min, con disolvente de desarrollo A: 0.1 % TFA acuoso, B: 0.09 % de TFA/10 % de agua/90 % de acetonitrilo, gradiente A:B = 90:10 -> 75:25 %, 15 minutos de elución en gradiente de concentración lineal] para obtener un complejo de cadena de azúcar-polipéptido representado por la siguiente fórmula (95) (SEQ ID NO. 60) (31.2 mg).

## [Fórmula Química 90]



Fórmula (95)

- 10 **[0280]** ESI-MS: (m/z) calculado para C<sub>120</sub>H<sub>201</sub>N<sub>35</sub>O<sub>62</sub>: [M+2H]<sup>2+</sup> 1564.1, [M+3H]<sup>3+</sup> 1043.0, [M+4H]<sup>4+</sup> 782.5, encontrado: 1563.7, 1043.8, 782.3.

(Ejemplo 1) Evaluación de la propiedad del hidrogel mediante la prueba de carga de bolas de acero-1

- 15 **[0281]** Se disolvieron 10 mg del complejo de cadena de azúcar-polipéptido o 10 mg del polipéptido de control en 500  $\mu$ L de agua ultrapura para preparar soluciones de polipéptidos al 2 % en peso. Cantidades iguales de esta solución y diversos reguladores se agregaron cada uno a un tubo de Durham (6x30 mm, Maruemu Corporation), y se crearon hidrogeles con una concentración de péptido del 1 % en peso mediante agitación vigorosa con vórtex. Al hacerlo, se utilizaron como regulador citrato-fosfato (pH 2.0 y 3.5), regulador fosfato (pH 7.4) y regulador fosfato-hidróxido de sodio (pH 11.5). La superficie del hidrogel dentro del tubo de Durham se colocó horizontalmente, se dejó en reposo durante 20 minutos en condiciones de temperatura ambiente, y se cargó una bola de acero (diámetro 1.56 mm, peso 16 mg, FUNABE SEIKO Co., Ltd.) en el hidrogel. Después de 10 minutos, se observó la posición de la bola de acero mediante confirmación visual.

- 25 **[0282]** La posición de la bola de acero dentro del tubo de Durham se evaluó en 3 grados. El estado de la bola de acero que permanece cerca de la superficie del hidrogel se estableció como  $\circ$ , el hundimiento después de cargarse y la permanencia interna se estableció como  $\Delta$ , y el hundimiento hasta el fondo del tubo de Durham se estableció como X. Además, se agregó \* a aquellos en los que el hidrogel no era uniforme y se observaba material turbio o insoluble (precipitado). Se pensó que un hidrogel en donde la bola de acero se mantiene alrededor de la superficie ( $\circ$ ) y que no se ve nada de materia insoluble (no \*) es un gel transparente y uniforme. Las fotografías obtenidas se muestran en la Figura 1, y los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 1.

**[0283]** En la Tabla 1, el "número de residuos de azúcar" indica el número total de residuos de azúcar presentes en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido. Además, los números compuestos indicados en la tabla se asignan por conveniencia en la descripción y no coinciden con el número del ejemplo de fabricación.

5 [Tabla 1]

**[0284]**

Tabla 1

No.	Nombre del compuesto	No. de residuos de azúcar	pH			
			2.0	3.5	7.4	11.5
1	(RADA)4	-	○	Δ*	x*	x*
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	○	○	○	○

10 **[0285]** Como se muestra en la Figura 1 y la Tabla 1, C(DiGlcNAc)-(RADA)4 formó hidrogeles transparentes y uniformes en todos los rangos de pH (pH 2.0-pH 11.5), y retuvo la bola de acero cerca de la superficie del hidrogel. Por otro lado, (RADA)4 formó un hidrogel transparente y uniforme a pH 2.0 y retuvo la bola de acero cerca de la superficie del hidrogel, pero formó un hidrogel no uniforme con turbidez a pH 3.5 o superior, y la bola de acero penetró en el interior de el hidrogel o se hundió hasta el fondo del tubo de Durham.

15 **[0286]** De lo anterior, se encontró que C(DiGlcNAc)-(RADA)4 puede formar un hidrogel transparente y uniforme mientras mantiene la resistencia del hidrogel a un pH neutro.

(Ejemplo 2) Evaluación de la propiedad del hidrogel mediante la prueba de carga de bolas de acero - 2

**[0287]** Se llevaron a cabo pruebas de carga de bolas de acero con C(Disialo)-(RADA)4, C(Asialo)-(RADA)4, C(Disialo)-(RADA)5, C(DiGlcNAc)-(RADA)5, y (RADA)4 con un método similar al del Ejemplo 1. Los resultados de la evaluación obtenidos se muestran en la Tabla 2.

20 [Tabla 2]

**[0288]**

Tabla 2

No.	Nombre compuesto	No. de residuos de azúcar	pH	
			3.5	7.4
1	(RADA)4	-	Δ*	x*
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	○	○
3	C(Disialo)-(RADA)4	11	○	○
4	C(Asialo)-(RADA)4	9	○	○
5	C(Disialo)-(RADA)5	11	○	○
6	C(Asialo)-(RADA)5	9	○	○
7	C(DiGlcNAc)-(RADA)5	7	○	○

25 **[0289]** Como se muestra en la Tabla 2, aquellos que tenían una modificación de una cadena de azúcar relativamente grande al final de (RADA)4 formaron hidrogeles transparentes y uniformes a la vez que mantenían la resistencia del hidrogel a un pH neutro. Se piensa que esto es el resultado de la modificación del polipéptido con una cadena de azúcar voluminosa con alta solubilidad en agua, actuando de este modo para suprimir la asociación excesiva entre las cadenas peptídicas, mejorar la solubilidad en agua del conjunto, o ambos.

30

**[0290]** A partir de lo anterior, se encontró que los complejos de cadena de azúcar-polipéptido que son (RADA)4 o (RADA)5 modificados con diversas cadenas de azúcar también pueden formar hidrogeles transparentes y uniformes mientras se mantiene la resistencia del hidrogel a un pH neutro.

(Ejemplo 3) Evaluación de la propiedad del hidrogel mediante la prueba de carga de bolas de acero - 3

5 **[0291]** De forma similar al método del Ejemplo 1, los ensayos de carga de bolas de acero se llevaron a cabo con C(DiGlcNAc)-(RADA)4 con concentraciones de hidrogel de 1 % en peso, 0.5 % en peso y 0.25 % en peso. Los resultados de la evaluación obtenidos se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

**[0292]**

10

Tabla 3

No.	Nombre del compuesto	No. de residuos de azúcar	Concentración de hidrogel	pH	
				3.5	7.4
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	1 % en peso	○	○
			0.5 % en peso	○	○
			0.25 % en peso	×	○

15

**[0293]** Como se muestra en la Tabla 3, C(DiGlcNAc)-(RADA)4 formó un hidrogel uniforme a pH 7.4 incluso en un rango de baja concentración. Además, C(DiGlcNAc)-(RADA)4 formó un hidrogel uniforme solo a pH 7.4 cuando la concentración de hidrogel se redujo a 0.25 % en peso. A partir de esto, se encontró que C(DiGlcNAc)-(RADA)4 puede controlar la formación de hidrogel por pH cuando la concentración de hidrogel es baja.

20

**[0294]** En otras palabras, se encontró que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención puede formar un hidrogel transparente y uniforme mientras se mantiene la resistencia del hidrogel en una solución acuosa que tiene un pH neutro incluso cuando la concentración de hidrogel es baja. Se descubrió además que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención puede controlar la formación de hidrogel por pH cuando la concentración de hidrogel es baja.

(Ejemplo 4) Evaluación de la propiedad del hidrogel mediante la prueba de carga de bolas de acero - 4

25

Con un método similar al del Ejemplo 1, excepto que se llevaron a cabo con la concentración de hidrogel a 0.5 % en peso, se realizaron pruebas de carga de bolas de acero con C(DiGlcNAc)-(RADA)4, 2C(Maltosa)-(RADA)4, 2C(maltotriosa)-(RADA)4, C(maltosa)-(RADA)4-C(maltosa), C(maltotriosa)-(RADA)4-C(maltotriosa), 3C(maltosa)-(RADA)4, (RADA)4-C(DiGlcNAc), C(Maltoheptaosa)-(RADA)4, (RATARAEA)2, y C(DiGlcNAc)-(RATARAEA)2. Los resultados de la evaluación obtenidos se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

**[0296]**

Tabla 4

No.	Nombre del compuesto	No. de residuos de azúcar	pH	
			3.5	7.4
1	(RADA)4	-	x*	x*
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	○	○
8	2C(Maltosa)-(RADA)4	4	○*	x*
9	2C(Maltotriosa)-(RADA)4	6	○	○
10	C(Maltosa)-(RADA)4-C(Maltosa)	4	○*	x*
11	C(Maltotriosa)-(RADA)4-C(Maltotriosa)	6	○	○
12	3C(Maltosa)-(RADA)4	6	○	○
13	(RADA)4-C(DiGlcNAc)	7	○	○

No.	Nombre del compuesto	No. de residuos de azúcar	pH	
			3.5	7.4
14	C(PEG2000)-(RADA)4	-	x	x
15	C(PEG2000)-(RADA)5	-	x	x
16	(RATARAEA)2	-	x*	x*
17	C(DiGlcNAc)-(RATARAEA)2	7	o	o

**[0297]** Como se muestra en la Tabla 4, No. 2, 9, 11, 12, 13 y 17, en la que el número total de residuos de azúcar presentes en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido es 5 o más en hidrogeles transparentes formado e uniformes a pH 3.5 y pH 7.4. Aunque no se muestra en la Tabla, un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que tiene C(DiBn-Disialo) unido al extremo N-terminal de (RADA)4 (11 residuos de azúcar) también formó un hidrogel transparente y uniforme a pH 7.4. Por otro lado, los números 8 y 10 en los que el número total de residuos de azúcares presentes en la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido es 4 o menos no formaron hidrogeles a pH 7.4. En otras palabras, quedó claro que cuando una cadena de azúcar en la que el número total de residuos de azúcar es 5 o más está unida a un polipéptido que tiene una naturaleza de autoensamblaje en una solución acuosa, dicho complejo de cadena de azúcar-polipéptido viene a mostrar una alta solubilidad en agua y forma un hidrogel transparente y uniforme en el rango neutro.

**[0298]** Además, quedó claro que se forma un hidrogel transparente y uniforme a pH 3.5 y pH 7.4 no solo cuando la cadena de azúcar unida al complejo de cadena de azúcar-polipéptido posee una ramificación por sí misma (como las cadenas de azúcar diGlcNAc de No. 2 y No. 13, así como las cadenas de azúcar disialo y asialo que se muestran en la Tabla 2), pero también cuando se trata de cadenas de azúcar lineales (como las cadenas de azúcar maltosa o maltotriosa), siempre que la cadena de azúcar posea una ramificación en el complejo de cadena de azúcar-polipéptido en su conjunto al tener dos o más unidos a un polipéptido, como con el No. 9, No. 11 y No. 12.

**[0299]** Además, aunque se conoce un método de unión de PEG al polipéptido para mejorar la solubilidad en agua del polipéptido, cuando PEG2000 se unió a (RADA)4 y (RADA)5 (No. 14 y No. 15), no se observaron materias insolubles, pero no se formaron hidrogeles uniformes a pH 3.5 y pH 7.4. En otras palabras, quedó claro que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención muestra una mayor solubilidad en agua y forma un hidrogel más transparente y uniforme en comparación con un complejo polipéptido-PEG.

**[0300]** Además, las cadenas de azúcar están unidas a la porción N y C-terminal del polipéptido en el No. 11, y una cadena de azúcar está unida a la porción C-terminal del polipéptido en el No. 13. Ambos mostraron alta solubilidad en agua y formaron hidrogeles transparentes y uniformes a pH 3.5 y pH 7.4. En otras palabras, quedó claro que, en el complejo polipéptido de la cadena de azúcar de la presente invención, el sitio de unión de la cadena de azúcar puede ser no solo la porción N-terminal sino también la porción C-terminal del polipéptido, así como ambas porciones.

**[0301]** Además, de manera similar a (RADA)4 o (RADA)5, (RATARAEA)2 se conoce como un polipéptido que forma un hidrogel. La mejora de la capacidad de formación de gel cuando una cadena de azúcar se unió a (RATARAEA)2 se evaluó con pruebas de carga de bolas de acero. Como se muestra en la Tabla 4, el No. 16 en donde no hay una cadena de azúcar unida a (RATARAEA)2 formó un hidrogel no uniforme y turbio, y la bola de acero se hundió hasta el fondo del tubo de Durham a pH 3.5 y 7.4. Por otro lado, el No. 17, que es un complejo de cadena de azúcar-polipéptido en donde C(DiGlcNAc) se une a la porción N-terminal de (RATARAEA)2 formó un gel transparente y uniforme a pH 3.5 y pH 7.4. Aunque no se muestra en la Tabla, un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que tiene C(Asialo) unido al extremo N-terminal de (RATARAEA)2 formó de manera similar un hidrogel transparente y uniforme a pH 7.4. En otras palabras, quedó claro que se muestra una mayor solubilidad en agua y se forma un hidrogel más transparente y uniforme cuando una cadena de azúcar se une a un polipéptido que comprende (RATARAEA)2.

**[0302]** A partir de los resultados anteriores, se demostró que un complejo de cadena de azúcar-polipéptido que forma un gel transparente y uniforme en un amplio pH que incluye el rango neutro puede fabricarse uniendo una cadena de azúcar no solo a (RADA)4 sino también a los polipéptidos de diversas secuencias.

(Ejemplo 5) Evaluación de la propiedad del hidrogel mediante la prueba de carga de bolas de acero - 5

**[0303]** Las pruebas de carga de bolas de acero con N(Asialo)-(RADA)4, N(DiGlcNAc)-(RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 se llevaron a cabo con un método similar al del Ejemplo 1. Los resultados de la evaluación obtenidos se muestran en la Tabla 5.



[Tabla 5]

**[0304]**

Tabla 5

No.	Nombre del compuesto	No. de residuos de azúcar	pH	
			3.5	7.4
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	○	○
18	N(Asialo)-(RADA)4	9	○	○
19	N(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	○	○

5 **[0305]** Como se muestra en la Tabla 5, No. 18 y 19, que son complejos de cadena de azúcar-polipéptido unidos a asparagina, de manera similar al No. 2 que es un complejo de cadena de azúcar-polipéptido unido a cisteína, formando hidrogeles transparentes y uniformes a pH 3.5 y pH 7.4. En otras palabras, quedó claro que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención forma un hidrogel transparente y uniforme, incluso cuando el aminoácido al que está unida la cadena de azúcar no es cisteína.

10 (Ejemplo 6) Investigación de utilidad como matriz hemostática.

**[0306]** Se llevó a cabo una prueba de evaluación que emplea plasma sanguíneo de rata con el fin de verificar si un hidrogel que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención se puede utilizar como material hemostático.

15 **[0307]** Se prepararon soluciones de polipéptidos acuosos con un método similar al del Ejemplo 1. Se recogió sangre de ratas Crlj:WI de 7 semanas de edad con inyección de heparina sódica (Ajinomoto) y se obtuvo plasma sanguíneo del sobrenadante después del tratamiento de centrifugación. La solución acuosa de polipéptido, plasma sanguíneo y PBS se agregaron a un tubo de Durham, y se prepararon hidrogeles de modo que la concentración plasmática fue de 5 a 50 % y la concentración de polipéptido fue de 0.5 % en peso. Posteriormente, estos se dejaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego se realizaron pruebas de carga de bolas de acero con un método similar al del Ejemplo 1. Las fotografías de los hidrogeles después de dejarlos durante 20 minutos se muestran en la Figura 2, y los resultados de la evaluación se muestra en la Tabla 6.

[Tabla 6]

**[0308]**

25

Tabla 6

No.	Nombre del compuesto	Concentración de plasma				Notas
		50 %	25 %	10 %	5 %	
1	(RADA)4	Δ*	Δ*	×*	×*	El precipitado se verificó a todas las concentraciones. La bola fue retenida sobre el precipitado al 50 %.
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	○	○	○	○	

30 **[0309]** Como se muestra en la Figura 2 y en la Tabla 6, las soluciones de polipéptidos que comprenden C(DiGlcNAc)-(RADA)4 formaron hidrogeles uniformes independientemente de la concentración en plasma. Más sorprendentemente, C(DiGlcNAc)-(RADA)4 formó un hidrogel uniforme incluso en un estado de alta concentración a una concentración plasmática del 50 %. Por otro lado, para soluciones de polipéptidos que comprenden (RADA)4, la solución de polipéptidos se empañó y se observaron materias insolubles en todas las concentraciones plasmáticas. Además, se verificó el pH de cada hidrogel, y todos estaban entre pH 6 y 8. En otras palabras, quedó claro que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención no solo forma un hidrogel uniforme a un pH neutro, sino que también es menos probable que produzca materias insolubles y forma un hidrogel transparente incluso en presencia de plasma sanguíneo de alta concentración.

35 **[0310]** A partir de los resultados anteriores, se demostró que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención tiene un valor de utilidad extremadamente alto como una composición farmacéutica hemostática.

(Ejemplo 7) Investigación de la capacidad de liberación controlada de proteínas ácidas

**[0311]** Se llevó a cabo una prueba para investigar si un hidrogel que comprende el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención se puede utilizar como un vehículo de liberación controlada a un pH neutro.

5 **[0312]** Se empleó un regulador fosfato (pH 7.4) como regulador. Además, se empleó albúmina de suero bovino (BSA) fluorescente marcada con Alexa Fluor™ 488 (A13100, Life Technologies) como la proteína ácida que se encapsula en el hidrogel.

10 **[0313]** Los componentes se agregaron al tubo de modo que la concentración de la sal del regulador es de 0.15 M, la concentración de BSA es de 5  $\mu$ M y la concentración del polipéptido es de 0.25-1 % en peso, y se mezcla con vórtex. La mezcla se agregó al Sistema de Inserto Multiwell (351130, BD) a 50  $\mu$ l cada uno, y se dejó durante la noche en una incubadora a 37 grados (incubadora de CO<sub>2</sub> para cultivo celular, MCO-18AIC, SANYO) con oscurecimiento para preparar hidrogeles de encapsulación BSA. En la incubadora a 37 grados, el sistema de inserción se sumergió en una placa de fondo plano de 96 pozos (353928, BD) con un regulador idéntico al hidrogel agregado a 225  $\mu$ l cada uno, y la placa se agitó con un agitador de placa (placa MICRO PLATE MIXER NS-P, AS ONE Corporation, velocidad de rotación: 1/5 de la escala) para iniciar la prueba (0 horas). Posteriormente, la cantidad de fluorescencia que se filtró con el tiempo en el lado de la placa de fondo plano se midió con un lector de placa de fluorescencia (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC). Se creó una curva estándar con la BSA marcada con fluorescencia idéntica, y la concentración de proteína se calculó a partir de la cantidad de colorante fluorescente que se fugó. Los resultados para un hidrogel que comprende (RADA)<sub>4</sub> y un hidrogel que comprende C(DiGlcNAc)-(RADA)<sub>4</sub> se muestran en la Figura 3. Se empleó una solución de solo BSA agregada al regulador (sin SAP) como control. En la Figura 3, el eje Y muestra la concentración de BSA en la placa inferior plana y el eje X muestra el tiempo desde el inicio de la prueba.

15 **[0314]** Como se muestra en la Figura 3, la mayoría del BSA encapsulado en el hidrogel que comprende (RADA)<sub>4</sub> se fugó en poco tiempo después del inicio de la prueba. Además, su velocidad de fuga cuando el polipéptido fue de 0.5 % en peso o menos fue equivalentes a la velocidad de fuga de la solución sin ningún polipéptido, lo que demuestra que no posee capacidad de liberación controlada. Por otro lado, con el hidrogel que comprende C(DiGlcNAc)-(RADA)<sub>4</sub>, la velocidad de fuga de BSA fue lenta en comparación con la solución sin ningún polipéptido, incluso a una concentración tan baja como 0.25 % en peso, mostrando capacidad de liberación controlada.

20 **[0315]** En otras palabras, quedó claro que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención encapsula y retiene una proteína ácida a un pH neutro y posee un efecto de liberación controlada.

(Ejemplo 8) Investigación de la capacidad de liberación controlada de proteínas básicas

25 **[0316]** Se llevó a cabo una prueba de liberación controlada de manera similar al método descrito en el Ejemplo 7, excepto que se empleó una proteína básica Lisozima como la proteína para encapsular. La lisozima se marcó con Alexa Fluor™ 488 por el kit de etiquetado de proteínas Alexa Fluor™ 488 (A10235, Invitrogen) para su uso. Los resultados se muestran en la Figura 4.

30 **[0317]** Como se muestra en la Figura 4, la mayoría de la lisozima encapsulada en el hidrogel que comprende (RADA)<sub>4</sub> se filtró dentro de una hora después del inicio de la prueba. Además, su velocidad de fuga fue casi equivalentes a la velocidad de fuga de la solución sin ningún polipéptido, lo que demuestra que no posee capacidad de liberación controlada. Por otro lado, con el hidrogel que comprende C(DiGlcNAc)-(RADA)<sub>4</sub>, la velocidad de fuga de la lisozima fue lenta en comparación con la solución sin ningún polipéptido, incluso a una concentración tan baja como 0.25 % en peso, mostrando capacidad de liberación controlada.

35 **[0318]** En otras palabras, quedó claro que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención encapsula y retiene una proteína básica a un pH neutro y posee un efecto de liberación controlada.

40 (Ejemplo 9) Medición y análisis del dicroísmo circular (CD)

45 **[0319]** La medición de CD se llevó a cabo como una confirmación de que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención forma una estructura de lámina  $\beta$ . En general, las características de las longitudes de onda observadas cuando una sustancia tiene una estructura de lámina  $\beta$  son una absorción positiva a unos 197 nm y una absorción negativa a unos 216 nm. Por esta razón, el foco se colocó en el tamaño de estas longitudes de onda en la presente invención, y se investigó la influencia del pH en la estructura de la lámina  $\beta$ .

50 **[0320]** C(DiGlcNAc)-(RADA)<sub>4</sub> que es una realización de la presente invención o (RADA)<sub>4</sub> como control se disolvió en agua ultrapura. Se agregaron de uno a diez milimolar de soluciones acuosas de hidróxido de sodio a cada una de estas soluciones acuosas de polipéptidos para ajustar el pH, y se crearon soluciones acuosas de polipéptidos 100 mM a pH 2 o pH 7. Estas soluciones acuosas se transfirieron a celdas de cuarzo que tienen una longitud de trayectoria óptica de 0.1 cm. El espectro de CD se midió luego con un polarímetro de espectro

(J-805, Jasco) a longitudes de onda de 185-260 nm para la elipticidad (miligrado). La media de elipticidad del residuo se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\theta] = (\theta_{\text{obs}} / 10 \cdot l \cdot c) / r$$

5 donde  $\theta_{\text{obs}}$  representa la elipticidad medida en miligrados,  $l$  representa la longitud de la célula (cm),  $c$  representa la concentración (M) y  $r$  representa el número de residuos de aminoácidos.

**[0321]** El resultado para (RADA)4 se muestra en la Figura 5, y el resultado para C(DiGlcNAc)-(RADA)4 se muestra en la Figura 6.

10 **[0322]** Como se muestra en las Figuras 5 y 6, (RADA)4 y C(DiGlcNAc)-(RADA)4 mostraron una alta elipticidad molar a pH 2. Por otro lado, C(DiGlcNAc)-(RADA)4 mostró alta la elipticidad molar pero la elipticidad molar de (RADA)4 se redujo significativamente a pH 7. En otras palabras, quedó claro que (RADA)4 no formaba casi ninguna estructura de lámina  $\beta$  a un pH neutro, mientras que C(DiGlcNAc)-(RADA)4 forma una estructura de lámina  $\beta$  incluso a un pH neutro.

15 **[0323]** Se cree que el resultado anterior se debe a la supresión de la asociación excesiva de polipéptidos entre sí por la presencia de cadenas de azúcar para C(DiGlcNAc)-(RADA)4 para mantener la lámina  $\beta$ , mientras que para (RADA)4 la lámina  $\beta$  se redujo porque la asociación se promovió en exceso a pH neutro. Esto es coherente con el fenómeno en donde (RADA)4 produjo enturbiamiento/precipitación a un pH neutro en la prueba de carga de bolas de acero y no pudo formar un hidrogel rígido y uniforme (por ejemplo, la Figura 1).

**[0324]** A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención forma una estructura de lámina  $\beta$  a un pH neutro.

20 (Ejemplo 10) Medición y análisis de la viscosidad cinética.

**[0325]** Además de la resistencia del hidrogel verificada en la prueba de carga de bolas de acero, se llevó a cabo una medición de la viscosidad cinética para observar el cambio en la resistencia del hidrogel o la estabilidad del hidrogel a lo largo del tiempo.

25 **[0326]** Se empleó un reómetro (MCR302, Anton Paar GmbH) equipado con una placa paralela de acero inoxidable con un diámetro de 25 mm con una altura de separación de 0.3 mm para la medición de la viscosidad cinética. C(DiGlcNAc)-(RADA)4 que es una realización de la presente invención o (RADA)4 ya que el control se disolvió en agua ultrapura. Se agregaron cinco milimolar de solución acuosa de hidróxido de sodio a estas soluciones acuosas de polipéptidos para ajustar el pH para preparar hidrogeles al 0.5 % en peso a pH 7. Posteriormente, estos hidrogeles se transfirieron rápidamente a un reómetro configurado a 25 grados y ángulo de fase ( $\tan\delta$ ) fue monitoreado durante un curso de tiempo. (frecuencia = 1 Hz, distorsión = 10 %)

**[0327]** El resultado de esta medición se muestra en la Figura 7.

35 **[0328]** Como se muestra en la Figura 7, se mostró que se formó un hidrogel rígido con el hidrogel que comprende C(DiGlcNAc)-(RADA)4 ya que el ángulo de fase disminuyó rápidamente desde el inicio de la medición. Por otro lado, el hidrogel que comprende (RADA)4 tiene un gran ángulo de fase, lo que demuestra que se forma un hidrogel frágil, o se forma un hidrogel uniforme que es solo parcialmente rígido.

**[0329]** Esto es consistente con el fenómeno en donde (RADA)4 produjo un enturbiamiento/precipitación a un pH neutro en la prueba de carga de bolas de acero y no pudo formar un hidrogel rígido y uniforme (por ejemplo, la Figura 1).

40 **[0330]** A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el complejo de cadena de azúcar-polipéptido de la presente invención forma un hidrogel rígido a un pH neutro.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### **[0331]**

<110> GLYTECH, INC.

<120> COMPLEJO DE CADENA DE AZÚCAR-POLIPÉPTIDO

45 <130> OCKP1302F

<150> JP2013-075493

<151> 2013.03.30

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5



<223> OtBu  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (6)..(6)  
 5 <223> Pbf  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (8)..(8)  
 <223> OtBu  
 10  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Pbf  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (12)..(12)  
 <223> OtBu  
 15  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Pbf  
 20  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <223> OtBu  
 25  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Resina  
 30  
  
 <400> 4  
  
 Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
  
 Ala  
 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 35 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 40  
  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 5  
  
 Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
  
 45 Ala

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 10 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar disialo añadido  
 <220>  
 15 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 6  
 Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
**Ala**  
 20 <210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <220>  
 30 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar asialo añadida  
 <220>  
 35 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 7  
 Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
**Ala**  
 <210> 8  
 <211> 17  
 40 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 45 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar añadido DiGlcNAc

5

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 8

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**

10

**Ala**  
 <210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

20

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> DiMan cadena de azúcar añadido

25

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 9

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**

**Ala**  
 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

30

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

35

<220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

40

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar GlcNAc añadido

45

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 10

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**

1

5

10

15

**Ala**

5 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

10 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar maltoheptaosa añadido

15 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)

<400> 11

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
 1 5 10 15

**Ala**

20 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

30 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar beta-ciclodextrina agregada

35 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)

<400> 12

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
 1 5 10 15

**Ala**

40 <210> 13  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial





<222> (12)..(12)  
 <223> OtBu  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 5 <222> (14)..(14)  
 <223> Pbf  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 10 <222> (16)..(16)  
 <223> OtBu  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Pbf  
 15  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (20)..(20)  
 <223> OtBu  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Resina  
 20  
  
 <400> 14  
  
**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**  
  
  
**Ala Arg Ala Asp Ala**  
**20**  
 25 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (21)..(21)  
 35  
 <400> 15  
  
**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**  
  
  
**Ala Arg Ala Asp Ala**  
**20**  
 40 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>

<223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

5

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar disialo añadido

10

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (21)..(21)  
 <400> 16

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**

**Ala Arg Ala Asp Ala**  
**20**

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

20

<220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar asialo añadida

25

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (21)..(21)

30

<400> 17

**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**

**Ala Arg Ala Asp Ala**  
**20**

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

35

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

40

<220>  
 <221> CARBOHID



ES 2 703 979 T3

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala  
 20

- <210> 21
- <211> 21
- <212> PRT
- 5 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> sintetizada químicamente
- <220>
- 10 <221> ACETILACIÓN
- <222> (1)..(1)
- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (1)..(1)
- <223> PEG2000 agregado
- 15 <220>
- <221> AMIDACIÓN
- <222> (21)..(21)
- <400> 21

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala  
 20

- 20 <210> 22
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> sintetizada químicamente
- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (1)..(1)
- <223> Fmoc
- 30 <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (1)..(1)
- <223> Trt
- <220>
- 35 <221> UNIÓN
- <222> (2)..(2)
- <223> Pbf
- <220>
- 40 <221> UNIÓN
- <222> (4)..(4)
- <223> tBu
- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (6)..(6)

<223> Pbf  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (8)..(8)  
 5 <223> OtBu  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Pbf  
 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (12)..(12)  
 <223> tBu  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Pbf  
 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <223> OtBu  
 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Resina  
 25 <400> 22  
 Cys Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Ala  
 <210> 23  
 <211> 17  
 30 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 35 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 40 <400> 23  
 Cys Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Ala  
 <210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> secuencia artificial



<223> Pbf  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 5 <223> Trt  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Pbf  
 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (7)..(7)  
 <223> OtBu  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Pbf  
 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (11)..(11)  
 <223> OtBu  
 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Pbf  
 25 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 <223> OtBu  
 30 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Resina  
 <400> 26  
 35 **Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala**  
**1 5 10 15**  
 <210> 27  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 45 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <400> 27  
**Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala**  
**1 5 10 15**  
 50 <210> 28



<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <220>  
 10 <221> CARBOHID  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Cadena de azúcar asialo añadida  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 15 <222> (16)..(16)  
 <400> 28  
 Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15  
 <210> 29  
 <211> 16  
 20 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 25 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (3)..(3)  
 30 <223> Cadena de azúcar añadido DiGlcNAc  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <400> 29  
 Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 35 1 5 10 15  
 <210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> Fmoc  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Pbf  
 50 <220>

<221> UNIÓN  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Trt

5

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 <223> OtBu

10

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Pbf

15

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (7)..(7)  
 <223> OtBu

20

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Pbf

25

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (11)..(11)  
 <223> OtBu

30

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Pbf

35

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 <223> OtBu

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Resina

<400> 30

**Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala**  
**1 5 10 15**

40

<210> 31  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

45

<220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)

50

<400> 31

**Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala**  
**1 5 10 15**

<210> 32  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 10 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (2).. (2)  
 <223> Cadena de azúcar asialo añadida  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16) .. (16)  
 <400> 32  
**Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala**  
**1 5 10 15**  
 20 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 25 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1) .. (1)  
 <220>  
 <221> CARBOHID  
 30 <222> (2) .. (2)  
 <223> Cadena de azúcar añadido DiGlcNAc  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16) .. (16)  
 35 <400> 33  
**Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala**  
**1 5 10 15**  
 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 40 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Fmoc  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 50 <223> Trt

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 <223> OtBu  
 5 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Pbf  
 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (7)..(7)  
 <223> OtBu  
 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Pbf  
 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (11)..(11)  
 <223> OtBu  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Pbf  
 25 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 <223> OtBu  
 30 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Resina  
 <400> 34  
 Cys Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15  
 35 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 45 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <400> 35  
 Cys Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15  
 50 <210> 36  
 <211> 16  
 <212> PRT



- <222> (2) .. (2)  
 <223> Trt
- 5 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Pbf
- 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (5)..(5)  
 <223> OtBu
- 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Pbf
- 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> OtBu
- 25 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Pbf
- 30 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (13)..(13)  
 <223> OtBu
- 35 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Pbf
- 40 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <223> OtBu
- 45 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Resina
- <400> 38
- Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
**1 5 10 15**
- 40 **Asp Ala**
- <210> 39  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial
- 45 <220>  
 <223> sintetizada químicamente
- 50 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1) .. (1)

<221> AMIDACIÓN

<222> (18)..(18)

<400> 39

**Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
 1 5 10 15

**Asp Ala**

5

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10

<223> sintetizada químicamente

<220>

<221> ACETILACIÓN

<222> (1).. (1)

<220>

15

<221> CARBOHID

<222> (1)..(1)

<223> Cadena de azúcar maltosa añadida

<220>

20

<221> CARBOHID

<222> (2) .. (2)

<223> Cadena de azúcar maltosa añadida

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (18)..(18)

25

<400> 40

**Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
 1 5 10 15

**Asp Ala**

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

30

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sintetizada químicamente

<220>

<221> ACETILACIÓN

35

<222> (1) .. (1)

<220>

<221> CARBOHID

<222> (1)..(1)

<223> Cadena de azúcar maltotriosa añadida

40

<220>

<221> CARBOHID

<222> (2) .. (2)

<223> Cadena de azúcar maltotriosa añadida

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (18)..(18)

<400> 41

**Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
**1 5 10 15**

**Asp Ala**

5

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> sintetizada químicamente

<220>

<221> ACETILACIÓN

<222> (1)..(1)

<220>

15 <221> CARBOHID

<222> (1)..(1)

<223> Cadena de azúcar maltotetraosa añadida

<220>

20 <221> CARBOHID

<222> (2)..(2)

<223> Cadena de azúcar maltotetraosa añadida

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (18)..(18)

25

<400> 42

**Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
**1 5 10 15**

**Asp Ala**

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

30

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sintetizada químicamente

<220>

35 <221> UNIÓN

<222> (1)..(1)

<223> Fmoc

<220>

40 <221> UNIÓN

<222> (1)..(1)

<223> Trt

<220>

<221> UNIÓN

<222> (2)..(2)

<223> Trt



<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Trt

5

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (4).. (4)  
 <223> Pbf

10

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (6).. (6)  
 <223> OtBu

15

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Pbf

20

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (10)..(10)  
 <223> OtBu

25

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Pbf

30

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (14)..(14)  
 <223> OtBu

35

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16).. (16)  
 <223> Pbf

40

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 <223> OtBu

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (19).. (19)  
 <223> Resina

<400> 43

**Cys Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg**  
 1 5 10 15

**Ala Asp Ala**

45

<210> 44  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

50

<220>  
 <221> ACETILACIÓN

<222> (1)..(1)  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (19)..(19)

5 <400> 44

**Cys Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg**  
 1 5 10 15

**Ala Asp Ala**

<210> 45  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 10 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 15 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar maltosa añadida

20 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Cadena de azúcar maltosa añadida

25 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Cadena de azúcar maltosa añadida

30 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (19)..(19)

<400> 45

**Cys Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg**  
 1 5 10 15

**Ala Asp Ala**

<210> 46  
 <211> 17  
 35 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> UNIÓN  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Fmoc

<220>  
 <221> UNIÓN



<221> AMIDACIÓN

<222> (17)..(17)

<400> 47

**Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
 1 5 10 15

**Asp**

5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10

<223> sintetizada químicamente

<220>

<221> ACETILACIÓN

<222> (1) .. (1)

<220>

15

<221> CARBOHID

<222> (9) .. (9)

<223> Cadena de azúcar maltosa añadida

<220>

20

<221> AMIDACIÓN

<222> (17)..(17)

<400> 48

**Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala**  
 1 5 10 15

**Asp**

25

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sintetizada químicamente

<220>

30

<221> ACETILACIÓN

<222> (1).. (1)

<220>

<221> CARBOHID

<222> (9) .. (9)

35

<223> Cadena de azúcar maltotriosa añadida

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (17)..(17)

<400> 49

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala  
 1 5 10 15

**Asp**

- <210> 50
- <211> 17
- <212> PRT
- 5 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> sintetizada químicamente
- <220>
- <221> ACETILACIÓN
- 10 <222> (1).. (1)
- <220>
- <221> CARBOHID
- <222> (9) .. (9)
- <223> Cadena de azúcar maltotetraosa añadida
- 15 <220>
- <221> AMIDACIÓN
- <222> (17)..(17)
- <400> 50

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala  
 1 5 10 15

**Asp**

- 20 <210> 51
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> sintetizada químicamente
- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (1)..(1)
- <223> Fmoc
- 30 <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (1)..(1)
- <223> Trt
- <220>
- 35 <221> UNIÓN
- <222> (2) .. (2)
- <223> Pbf
- <220>
- 40 <221> UNIÓN
- <222> (4)..(4)
- <223> OtBu
- <220>
- 45 <221> UNIÓN
- <222> (6) .. (6)
- <223> Pbf

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (8)..(8)  
 <223> OtBu  
 5 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Pbf  
 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (12)..(12)  
 <223> OtBu  
 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Pbf  
 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <223> OtBu  
 25 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Trt  
 <223> Resina  
 <400> 51  
 Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
 30 Ala Cys  
 <210> 52  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 40 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 <400> 52  
 Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ala Cys  
 45 <210> 53

<211> 18  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1).. (1)  
  
 <220>  
 10 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar maltosa añadida  
  
 <220>  
 15 <221> CARBOHID  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Cadena de azúcar maltosa añadida  
  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 20 <400> 53  
  
**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**

**Ala Cys**

<210> 54  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 25 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 30 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1).. (1)  
  
 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Cadena de azúcar maltotriosa añadida  
  
 35 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Cadena de azúcar maltotriosa añadida  
  
 <220>  
 40 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (18)..(18)  
 <400> 54  
  
**Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp**  
**1 5 10 15**

**Ala Cys**

<210> 55

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fmoc  
  
 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Pbf  
  
 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 <223> OtBu  
  
 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Pbf  
  
 25 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (7)..(7)  
 <223> OtBu  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Pbf  
  
 30 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (11)..(11)  
 <223> OtBu  
  
 35 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Pbf  
  
 40 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 <223> OtBu  
  
 45 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Trt  
  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Resina  
  
 50 <400> 55



Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15

**Cys**

5 <210> 56  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 10 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 56

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15

**Cys**

15 <210> 57  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 25 <220>  
 <221> CARBOHID  
 <222> (17)..(17)  
 <223> DiGlcNAc cadena de azúcar añadido  
 30 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (17)..(17)  
 <400> 57

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15

**Cys**

35 <210> 58  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fmoc  
 5 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Pbf  
 10 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (3)..(3)  
 <223> OtBu  
 15 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Pbf  
 20 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (7)..(7)  
 <223> OtBu  
 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (9).. (9)  
 <223> Pbf  
 25 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (11)..(11)  
 <223> OtBu  
 30 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Pbf  
 35 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 <223> OtBu  
 40 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (16).. (16)  
 <223> Resina  
 <400> 58  
 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
 1 5 10 15  
 <210> 59  
 <211> 17  
 45 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintetizada químicamente  
 50 <220>  
 <221> ACETILACIÓN  
 <222> (1).. (1)  
 <220>  
 <221> CARBOHID



## REIVINDICACIONES

1. Un complejo de cadena de azúcar-polipéptido en donde dicho polipéptido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 8-34 residuos de aminoácidos en los que los residuos de aminoácidos polares y no polares están dispuestos alternativamente, y una o más cadenas de azúcar están unidas a dicho polipéptido.  
**caracterizado por que** el número total de residuos de azúcar presente en la una o más cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 5 o más.
2. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho complejo de cadena de azúcar-polipéptido puede formar un hidrogel que comprende una estructura de lámina  $\beta$  por autoensamblaje en una solución acuosa que tiene un pH aproximadamente neutro.
3. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** cada uno de dichos residuos de aminoácidos polares es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en un residuo de aspartato, un residuo de glutamato, un residuo de arginina, un residuo de lisina, un residuo de histidina, un residuo de tirosina, un residuo de serina, un residuo de treonina, un residuo de asparagina, un residuo de glutamina y un residuo de cisteína.
4. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, **caracterizado por que** cada uno de dichos residuos de aminoácidos no polares es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en un residuo de alanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, una isoleucina, un residuo de metionina, un residuo de fenilalanina, un residuo de triptófano, un residuo de prolina y un residuo de glicina.
5. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** cada uno de dichos residuos de aminoácidos polares es un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en un residuo de aspartato, un residuo de glutamato, un residuo de arginina y un residuo de treonina, y cada uno de dichos aminoácidos no polares es un residuo de alanina.
6. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha secuencia de aminoácidos es una secuencia repetitiva "RADA" o una secuencia repetitiva "RATARAEA".
7. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** dicha secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RADARADARADARADA (SEQ ID NO. 1), RADARADARADARADARADARADA (SEQ ID NO. 2), y RATARAEARATARAEA (SEQ ID NO. 3).
8. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 1, 2 o 3.
9. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** las cadenas de azúcar están unidas a cada aminoácido hasta la posición  $x$  contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido y cada aminoácido hasta la posición  $y$  contando a partir del residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal (donde  $x$  e  $y$  son números enteros,  $x \geq 0$ ,  $y \geq 0$ , y  $x + y$  es el número total de cadenas de azúcar unidas al polipéptido).
10. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 1, 2 o 3, en el cual cuando el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 1, dicha cadena de azúcar está unida al residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido o al residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal, cuando el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 2, dichas dos cadenas de azúcar están unidas a los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en (1)-(3) a continuación:
- (1) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido,
  - (2) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal de dicho polipéptido, y
  - (3) el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido y el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal de dicho polipéptido, y
- cuando el número de cadenas de azúcar unidas a dicho polipéptido es 3, dichas tres cadenas de azúcar están unidas a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en (1)-(4) a continuación:

- (1) los residuos de aminoácidos primero, segundo y tercero contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido,  
(2) los residuos de aminoácidos primero, segundo y tercero contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo C-terminal de dicho polipéptido,  
5 (3) el primer y segundo residuos de aminoácidos contando desde el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido, así como el residuo de aminoácido posicionado en el C-terminal de dicho polipéptido, y  
(4) el residuo de aminoácido posicionado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido, así como los  
10 residuos de aminoácidos posicionados en la posición 1 y 2 contando desde el extremo C-terminal de dicho polipéptido.
11. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha cadena de azúcar es una cadena de azúcar con una ramificación.
12. El complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que**  
15 dicha cadena de azúcar es una cadena de azúcar seleccionada del grupo que consiste en una cadena de azúcar disialo, una cadena de azúcar asialo, una cadena de azúcar diGlcNAc, una cadena de azúcar dimanosa, una cadena de azúcar GlcNAc, una cadena de azúcar maltotriosa, una cadena de azúcar maltosa, una cadena de azúcar maltotetraosa, una cadena de azúcar maltoheptaosa,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina.
13. Una composición para la formación de hidrogel que comprende un complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.  
20
14. Una composición que comprende un complejo de cadena de azúcar-polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizada por que** dicha composición está en un estado de hidrogel.
15. Una composición farmacéutica hemostática que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.  
25
16. Una composición para un vehículo de liberación controlada que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.
17. Una composición para matriz de cultivo que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.  
30

Figura 1

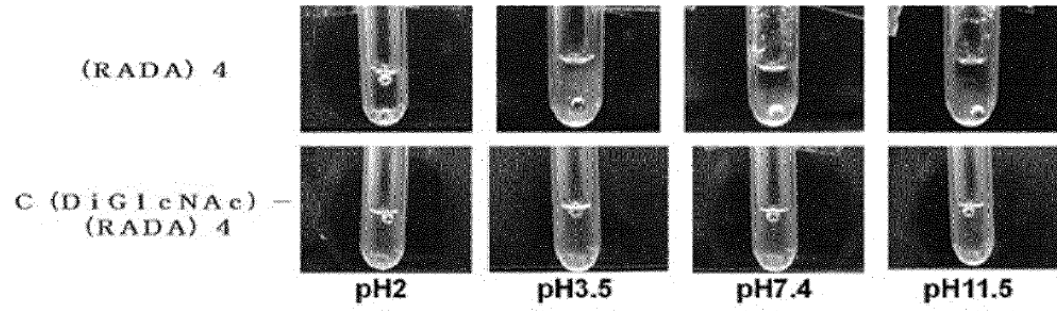


Figura 2

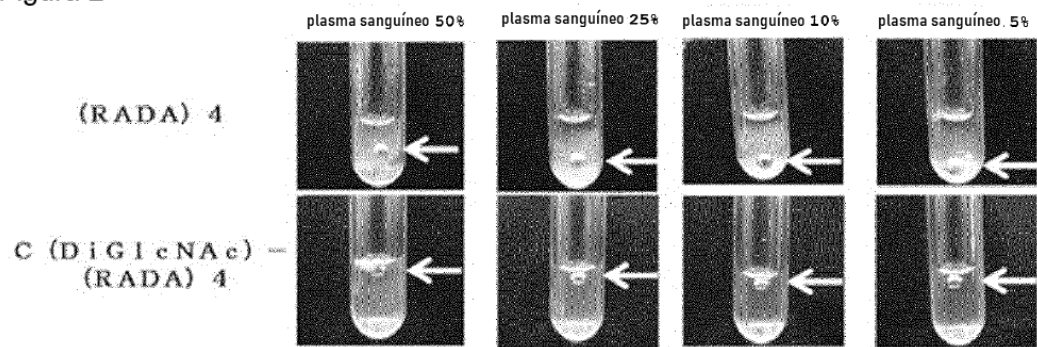


Figura 3

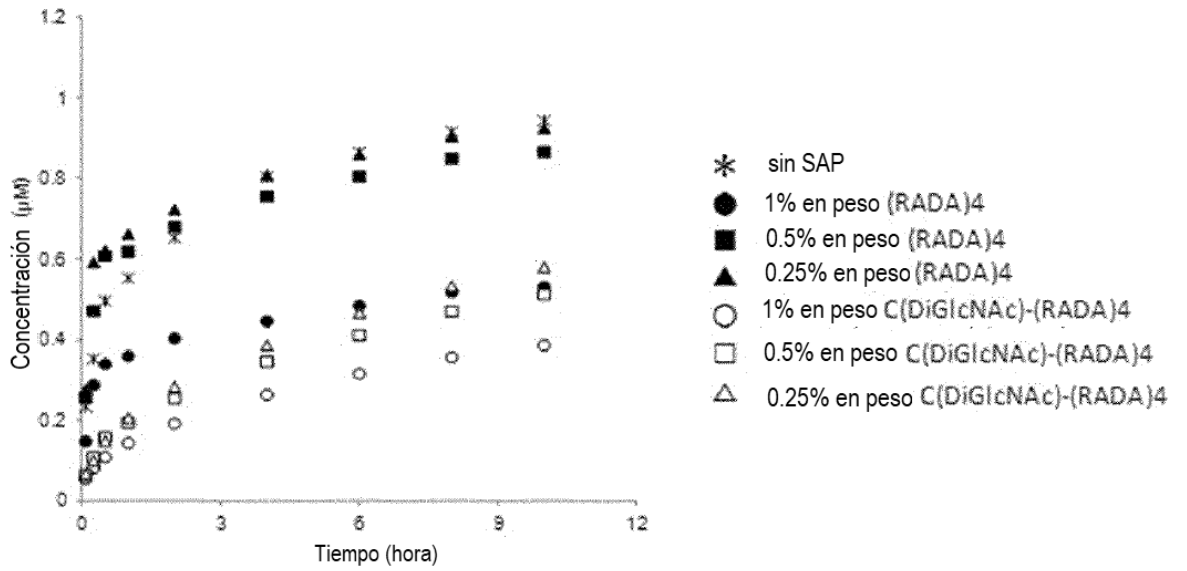


Figura 4

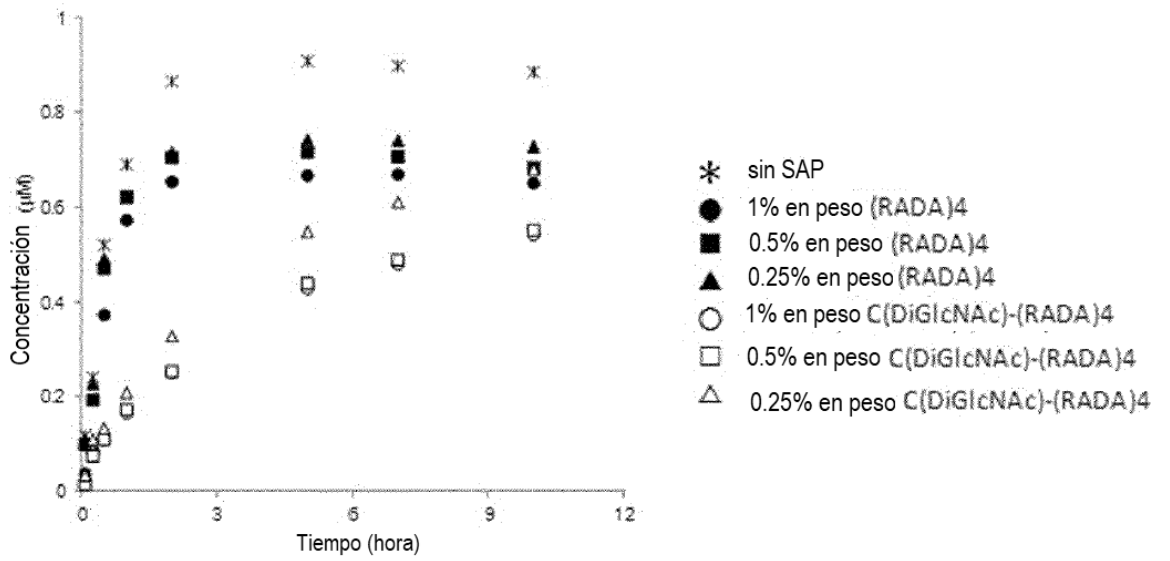


Figura 5

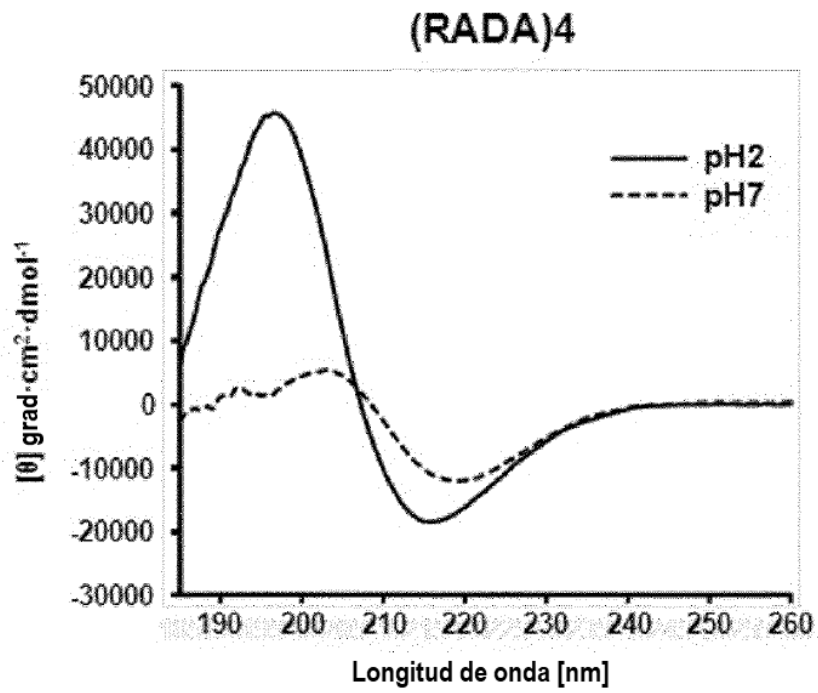


Figura 6

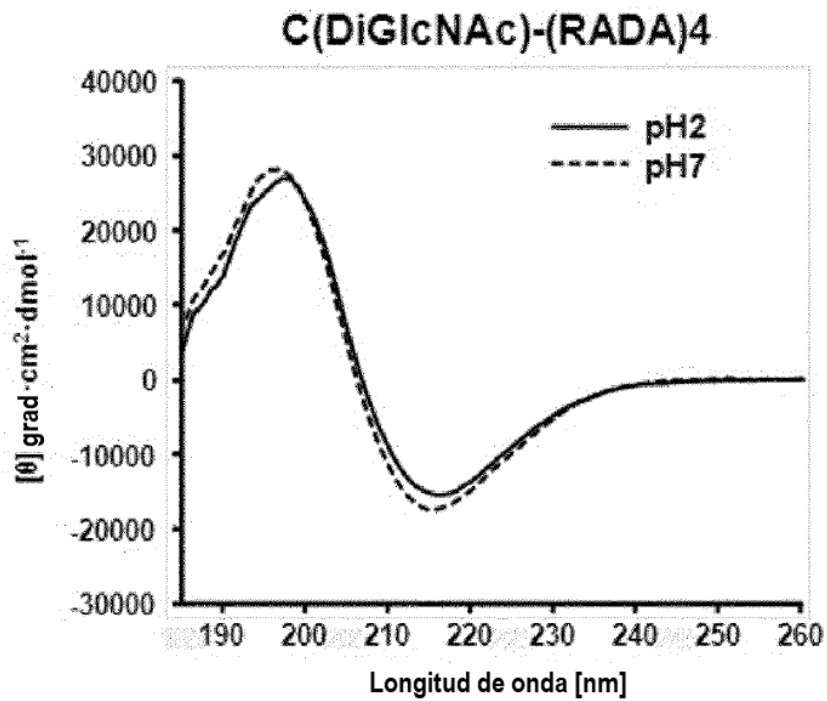




Figura 7

